

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I**



**TESIS DOCTORAL**

**Células natural killer como estrategia terapéutica frente a  
mieloma múltiple**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**Alejandra Leivas Aldea**

DIRECTOR

**Joaquín Martínez López**

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DPTO. BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



TESIS DOCTORAL

# **CÉLULAS NATURAL KILLER COMO ESTRATEGIA TERAPÉUTICA FRENTE A MIELOMA MÚLTIPLE**

Memoria que para optar al título de Doctor en Bioquímica, Biología molecular y  
Biomedicina presenta

**ALEJANDRA LEIVAS ALDEA**

Director

**Dr. Joaquín Martínez López**

Jefe del Servicio de Hematología del Hospital Universitario 12 de Octubre  
Profesor asociado de la Universidad Complutense de Madrid

MADRID, 2017









Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (EC11-036) y por la Fundación CRIS Contra El Cáncer.



A mis padres,  
“porque hija de tigre sale a rayas.”

A Miguel,  
“mi media langosta.”



## Agradecimientos:

En primer lugar, quiero agradecer a Joaquín Martínez por haber depositado su confianza en mí y haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis abriéndome las puertas de su laboratorio.

A Florinda Gilsanz, por sus ánimos y sus palabras de apoyo en todo momento.

A Ruth M. Risueño, por enseñarme, ayudarme y por convertirse en una gran compañera y amiga.

A Concepción Peiró y Carlos F. Sánchez Ferrer, por introducirme en el mundo de la investigación. A Tania, Elena, Susana y Laura, primeras compañeras de laboratorio y amigas, que tanto me han enseñado, de las que tanto aprendí y con las que tanto disfruté, sin ellas mis conocimientos de laboratorio no serían lo que son.

A Alicia, mi hermana de tesis, porque hemos trabajado juntas, sufrido juntas, cantado juntas (incluso tu hit “esplenomegalia”), y éste es nuestro premio. Hemos hecho este largo recorrido juntas, y sin ti no hubiese igual. A Ana, por allanarme el camino en mi andadura por los ensayos clínicos y enseñarme. A Roberto, por todos sus consejos, eres el más *grande*. A Inma, porque la secuenciación masiva no es rival para ella, y sin ella sí lo hubiera sido para mí.

A Cristina, Rebeca y María, por facilitarme tanto la vida con todas las muestras que les he pedido. Por su amabilidad, porque son encantadoras.

A todos mis compañeros y a las técnicas de laboratorio. A todo el personal del servicio de hematología.

A Lucía y Antonio, por dejarme formar parte de su “NK team” y por compartir conmigo las maravillas de las células NK.

A todos los servicios de citometría que en algún momento me han dejado utilizar sus citómetros, tanto de hematología como de inmunología. A Carmen por todos los *sortings*. Al servicio de citometría del CNIO, Lola y Miguel Ángel, por su ayuda. Al servicio de microscopía del CNIO Diego, Manu y Ximo, trabajar con gente tan agradable como vosotros es un placer.

A mis abuelos, porque sé lo enormemente orgullosos que estarían.

A mi familia, porque esta tesis es también vuestra. A Efrén y Golfo, a Álvaro, Almudena, Kris y Xinyao, a mis tíos Rafa, Lys, Gema, Fran y Marisol, a mis tíos Miriam y Héctor, y mis primas Sandra y Jessi. A todos, gracias, muchas gracias por haberme soportado y a la vez animado siempre.



A Miguel, no podría haber logrado nada si no hubieses estado a mi lado siempre. Por esa paciencia infinita, por no dejarme caer nunca, por disfrutar y sufrir conmigo, por apoyarme tanto, por las largas esperas, por mis “ya voy”. Por todo el tiempo que este trabajo nos ha robado y por compartirlo todo conmigo.

A mis padres, esta tesis es por y para ellos. Por haberme convertido en la persona que soy. Absolutamente nada de lo logrado en todos estos años hubiera sido posible sin su apoyo incondicional (mi madre aún confía en que ganaré el Nobel), sin su esfuerzo y sin sus consejos. Ellos me han dado alas para confiar en que puedo conseguir todo lo que me proponga. En ello estoy. Os quiero.





“En la vida, al contrario que en el ajedrez, el juego continúa después del jaque mate”

Isaac Asimov



# Índice

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>7</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>15</b>
<b>1. MIELOMA MÚLTIPLE .....</b>	<b>17</b>
1.1. Definición y aspectos generales.....	17
1.2. Epidemiología.....	17
1.3. Etiología.....	18
1.4. Patogenia .....	20
1.5. Fisiopatología y clasificación del mieloma múltiple.....	22
1.6. Evolución clonal del mieloma múltiple .....	25
1.7. La célula plasmática .....	28
1.7.1. Identificación y caracterización de la célula plasmática .....	28
1.7.2. Identificación de la célula madre de mieloma múltiple .....	31
1.8. Tratamiento del mieloma múltiple .....	33
<b>2. CÉLULAS NATURAL KILLER .....</b>	<b>36</b>
2.1. Descripción.....	36
2.2. Función.....	37
2.3. Integración de señales y activación .....	38
2.4. Receptores de células NK.....	39
2.4.1. Receptores inhibidores .....	39
2.4.2. Receptores activadores .....	40
2.5. Mecanismo de citotoxicidad .....	42
<b>3. TERAPIA CELULAR .....</b>	<b>45</b>

3.1. Vacunas de células dendríticas .....	46
3.2. Terapia basada en receptores quiméricos antigénicos.....	47
3.3. Reprogramación de células madre .....	50
3.4. Terapia con linfocitos activados <i>ex vivo</i> .....	51
<b>JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO .....</b>	<b>55</b>
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>59</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>63</b>
1. PACIENTES Y MUESTRAS .....	65
2. CULTIVOS DE LÍNEAS CELULARES.....	65
3. ESTUDIOS EN NKS Y NKS ACTIVADAS Y EXPANDIDAS .....	67
3.1. Obtención de células mononucleares.....	67
3.2. Obtención y cultivo de células NKAEs.....	68
3.2.1. Preparación de células mononucleares de sangre periférica .....	68
3.2.2. Preparación de las K562-mb15-41BBL .....	69
3.3. Caracterización de células NK y NKAEs .....	70
3.3.1. Citometría de flujo .....	70
3.3.2. Inmunofluorescencia indirecta de NKG2D y NKp30.....	74
3.3.3. Microscopía confocal .....	75
3.4. Estudios de función celular .....	76
3.4.1. Citotoxicidad en suspensión.....	76
3.4.2. Ensayos clonogénicos.....	79
3.4.3. Bloqueo de receptores .....	81
3.4.4. Purificación de células NKA E .....	81
3.4.5. Microscopía <i>in vivo</i> .....	82
3.5. Estudios de seguridad .....	83
3.5.1. Extracción de ARN .....	84
3.5.2. Transcripción inversa de ARN.....	85
3.5.3. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa .....	86
3.5.4. Estudios funcionales frente a células de médula ósea sana .....	90

4.	CARACTERIZACIÓN DE SIDE POPULATION DE MIELOMA MÚLTIPLE .....	91
4.1.	Caracterización de <i>side population</i> .....	91
4.2.	Citometría de flujo y purificación de <i>side population</i> .....	92
4.3.	Construcción de librerías de ADNc y secuenciación masiva de nueva generación ..	94
5.	ENSAYO CLÍNICO NK-VS-MM .....	101
5.1.	Diseño del estudio y criterios de inclusión .....	101
5.2.	Pacientes .....	103
5.3.	Protocolo y esquema de tratamiento .....	104
5.4.	Monitorización de la enfermedad.....	106
5.5.	Estudios biológicos asociados .....	106
5.5.1.	Análisis de citoquinas en suero .....	108
5.5.2.	Análisis de linfocitos T reguladores .....	109
5.5.3.	Extensiones de SP.....	110
6.	MATERIALES .....	111
7.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	111
8.	CONSIDERACIONES ÉTICAS .....	112
	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>113</b>
1.	LAS CÉLULAS NK PUEDEN ACTIVARSE, EXPANDIRSE Y DESTRUIR LAS CÉLULAS DE MM.....	115
1.1.	Actividad citotóxica de células NK sobre células de MM y sobre la célula tumoral clonogénica de MM.....	115
1.2.	Activación y expansión de células NK de pacientes con MM .....	122
1.3.	Capacidad citotóxica de las células NKAe frente a la célula de MM y frente a la célula tumoral clonogénica .....	125
2.	EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE LOS RECEPTORES DE SUPERFICIE EN NKAes ..	134
2.1.	Expresión de receptores de citotoxicidad en células NKAe .....	134
2.2.	Efecto del bloqueo de los receptores NKG2D y NKp30 en la citotoxicidad de las células NKAe .....	137

3.	DESTRUCCIÓN DE LA SIDE POPULATION DE MM POR LAS CÉLULAS NKAЕ .....	141
3.1.	Caracterización de células de <i>side population</i> de MM .....	141
3.1.1.	Detección de <i>side population</i> .....	141
3.1.2.	Expresión de genes de células madre en las células <i>side population</i> de MM .....	145
3.1.3.	Expresión de ligandos de células NK en células de la <i>side population</i> .....	147
3.2.	Identificación y destrucción de las células de la <i>side population</i> por parte de las células NKAЕ .....	150
3.3.	Seguridad de las células NKAЕ frente a la célula madre hematopoyética sana CD34 <sup>+</sup> .....	152
4.	USO CLÍNICO DE CÉLULAS NKAЕ: ENSAYO CLÍNICO NK-VS-MM .....	155
4.1.	Producción de células NKAЕ a gran escala para su uso clínico .....	155
4.2.	Seguridad las células NKAЕ <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	157
4.3.	Eficacia de la administración de dosis repetidas de células NKAЕ.....	160
4.4.	Detección de las células NKAЕ tras infusión .....	163
4.5.	Efecto del tratamiento farmacológico sobre las NKAЕs infundidas.....	167
4.6.	Detección de mecanismos de regulación negativa .....	168
	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>171</b>
	Los pacientes con MM poseen una disfunción en sus células NK y ésta afecta a la destrucción de la célula tumoral clonogénica .....	173
	Las células NK de pacientes con MM pueden activarse, recuperan la actividad citotóxica y destruyen la célula tumoral clonogénica de MM.....	176
	Las células NKAЕ muestran un fenotipo altamente citotóxico y median su actividad antimieloma a través de los receptores NKG2D y NKp30.....	181
	Las células de la <i>side population</i> expresan ligandos de células NK y muestran características moleculares propias de célula madre tumoral.....	185
	La infusión de células NKAЕ autólogas no produce toxicidad y muestra eficacia en pacientes con MM refractario.....	190

**CONCLUSIONES .....195**

**BIBLIOGRAFÍA .....199**

**ANEXO I.....225**

**ANEXO 2.....245**





// Abreviaturas



<b>ABC:</b> <i>ATP-binding cassette</i>	<b>CRAB:</b> <i>Calcium, Renal insuficiency, Anemia, Bone lesions</i> / Calcio, insuficiencia renal, anemia y lesiones óseas
<b>Abs:</b> absorbancia	
<b>ADN:</b> ácido desoxirribonucleico	
<b>ADNc:</b> ácido desoxirribonucleico complementario	
<b>AMO:</b> aspirado de médula ósea	<b>Ct:</b> <i>cycle treshold</i> / ciclo umbral
<b>ANOVA:</b> análisis de la varianza	<b>CTCAE:</b> Common Terminology Criteria for Adverse Events / criterios de terminología común para eventos adversos
<b>APC:</b> <i>allophycocyanin</i> / alofococianina	
<b>APC/Cy7:</b> <i>allophycocyanin cyanin 7</i> / alofococianina cianina 7	<b>DAPI:</b> 4',6-diamidino-2-fenilindol 2 HCl
<b>ARN:</b> ácido ribonucleico	<b>DCV:</b> <i>dye cycle violet</i> / sonda de ciclo violeta
<b>ARNm:</b> ácido ribonucleico mensajero	<b>DE:</b> desviación estándar
<b>ARNr:</b> ácido ribonucleico ribosómico	<b>DMSO:</b> dimetil sulfóxido
<b>BATDA:</b> <i>bis (acetoxymethyl) 2,2':6',2''-terpyridine- 6,6''- dicarboxylate</i>	<b>DNAM-1:</b> <i>DNAX Accessory Molecule-1</i>
<b>B2M:</b> β-2-microglobulina	<b>DNasa:</b> desoxirribonucleasa o nucleasa de ADN
<b>Bcr-Abl:</b> <i>breakpoint cluster region-Abelson tyrosine-protein kinase</i>	<b>dNTP:</b> desoxinucleótido trifosfato
<b>BEN:</b> bendamustina	<b>ECOG:</b> <i>Eastern Cooperative Oncology Group</i> / Grupo Cooperativo del Este en Oncología
<b>BGUS:</b> gen de la β glucuronidasa	<b>EDTA:</b> ácido etilendiaminotetraacético
<b>BOR:</b> bortezomib	<b>EudraCT:</b> <i>European Union Drug Regulating Authorities Clinical Trials</i> / Autoridad de la Unión Europea de regulación de fármacos en ensayos clínicos
<b>BSA:</b> albúmina sérica bovina	
<b>BV:</b> <i>brilliant violet</i>	<b>FAM:</b> carboxifluoresceína
<b>c-Myc:</b> <i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>	<b>Fc:</b> fracción constante
<b>CD:</b> cluster de diferenciación	<b>FBS:</b> suero bovino fetal
<b>CFU:</b> <i>colony-forming unit</i> / unidad formadora de colonias	<b>FITC:</b> <i>fluorescein isothiocyanate</i> / isotiocianato de fluoresceína
<b>CMF:</b> citometría de flujo	
<b>CMSP:</b> células mononucleares de sangre periférica	
<b>CP:</b> célula plasmática	

**FRET:** transferencia energética de fluorescencia por resonancia

**FSC:** *forward scatter channel* / canal de dispersión frontal

**GMSI:** gamapatía monoclonal de significado incierto

**GMP:** *Good manufacturing practice* / Buenas prácticas de manufacturación

**GO:** Gene Ontology

**H12O:** Hospital Universitario 12 de Octubre

**H<sub>2</sub>Od:** agua destilada

**HEPES:** ácido N-2-hidroxietilpiperacín-N'-2- etanosulfónico

**HLA:** antígeno leucocitario humano

**HNJ:** Hospital Universitario Niño Jesús

**ID:** *inside diameter* / diámetro interno

**IFN- $\gamma$ :** interferón  $\gamma$

**Ig:** inmunoglobulina

**IL:** interleuquina

**IL-2:** interleuquina-2

**IL-4:** interleuquina-4

**IL-6:** interleuquina-6

**IL-10:** interleuquina-10

**IL-15:** interleuquina-15

**IL-17A:** interleuquina-17A

**IMDM:** Iscove's modified Dubelcco's medium / medio Iscove modificado por Dubelcco

**IMiDs:** *immunomodulatory drugs* / fármacos inmunomoduladores

**IMWG:** *International Myeloma Working Group* / Grupo de trabajo internacional de mieloma

**IQR:** *interquartil range* / rango intercuartil

**ISS:** international staging system / índice de estadificación internacional

**ITAM:** *immunoreceptor tyrosine-based activating motif* / motivo activador de inmunorreceptor basado en tirosina

**ITIM:** *immunoreceptor tyrosine-based inhibiting motif* / motivo inhibidor de inmunorreceptor basado en tirosina

**K:** cadena ligera kappa

**K562-mb15-41BBL:** línea celular derivada de la línea K562

**KIR:** *Killer Ig-like receptor*

**$\lambda$ :** cadena ligera lambda

**LCP:** leucemia de células plasmáticas

**LEN:** lenalidomida

**MFI:** intensidad media/mediana de fluorescencia

**Min:** minuto

**MM:** mieloma múltiple

**MO:** médula ósea

**NA:** *numerical aperture* / apertura numérica

**NGS:** *"next generation sequencing"* / secuenciación de nueva generación

**NK:** célula *natural killer* / célula asesina natural

**NKAE:** célula natural killer activada y expandida

**NKT:** células NKT

**NSP:** células no pertenecientes a la *side population*

**OD:** *outside diameter* / diámetro externo

**pb:** pares de bases

**PBS:** tampón fosfato salino

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**PE:** *phycoerythrin* / ficoeritrina

**PEF:** medio constituido por PBS, EDTA, FBS y azida sódica

**PerCP/Cy5.5:** *peridinin-chlorophyll Cyanin 5.5 protein* / proteína clorofila peridinina cianina 5.5

**PE/Cy7:** *phycoerythrin cyanin 7* / ficoeritrina cianina 7

**PI:** *propidium iodide* / yoduro de propidio

**Pico M:** pico o componente monoclonal

**QPCR:** reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

**RAN:** recuento absoluto de neutrófilos

**RES:** reserpina

**RNasa:** ribonucleasa o nucleasa de ARN

**ROX:** carboxi-X-rodamina

**RPM:** revoluciones por minuto

**RPMI 1640:** medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute 1640

**RT:** retrotranscripción o transcripción inversa

**Seg:** segundo

**SSC:** *side scatter channel* / canal de dispersión lateral

**SP:** sangre periférica

**TA:** temperatura ambiente

**TASPE:** trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica

**TDA:** *2,2':6',2''-terpyridine-6,6''-dicarboxylic acid*

**TE:** tampón de Tris y EDTA

**Tert:** gen de la telomerasa

**TNF- $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral  $\alpha$

**TRAIL:** *tumor-related apoptosis inducing ligand* / ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF

**Treg:** linfocito T regulador

**TRF:** *time resolved fluorescence* / fluorescencia en tiempo resuelto

**U.A:** unidades arbitrarias

**U.I:** unidades internacionales

**ULBP:** *UL16 binding protein* / proteína de unión a UL16



// Resumen





El mieloma múltiple (MM) se caracteriza por un exceso de células plasmáticas en médula ósea que sintetizan elevadas cantidades de proteína monoclonal. Esto produce destrucción ósea, daño renal e inmunodepresión. Los nuevos fármacos anti-mieloma han mejorado considerablemente el pronóstico de la enfermedad, pero ésta sigue siendo incurable debido a que estos fármacos no destruyen la célula madre de MM, aquella que muestra resistencia a fármacos y/o potencial proliferativo. Los pacientes con MM presentan una desregulación del sistema inmune que podría encontrarse en la base del desarrollo inicial de la enfermedad. Las terapias más avanzadas frente a MM se centran en la potenciación y estimulación del sistema inmune. Entre ellas, la terapia celular podría producir este efecto ejerciendo una acción citotóxica directa y a su vez estimulando otras células inmunes para producir una respuesta inmunológica mayor. Las células natural killer (NK) son candidatas idóneas para este cometido ya que son capaces de desencadenar una respuesta citotóxica al primer contacto con el antígeno tumoral, pueden activar vías de apoptosis celular y producir citoquinas que activan linfocitos B, T y células dendríticas. Este trabajo ha explorado la posibilidad de activar y expandir *ex vivo* células NK autólogas de pacientes con MM para evaluar su capacidad citotóxica *in vitro*, así como su seguridad y eficacia *in vivo* en el contexto de un ensayo clínico.

Así, por una parte, se observó que las células NK de pacientes con MM no eran capaces de destruir las células de MM y, concretamente, las células proliferativas o clonogénicas de MM, con la misma eficacia que las células NK de donantes sanos. Se realizó la expansión de estas células NK de pacientes mediante cocultivo con la línea modificada K562-mb15-41BBL. Tras 21 días, partiendo de  $11,74 \cdot 10^6$  células NK, se obtuvo un número de células NK activadas y expandidas (NKAEs) 16 veces superior, sin excesiva proliferación de linfocitos T CD3<sup>+</sup>. Se observó además que estas NKAe poseían una potente actividad citotóxica *in vitro*, incluso frente a la célula tumoral clonogénica, superior a la de células NK procedentes tanto de pacientes como de donantes sanos. Se realizó el inmunofenotipo de receptores de membrana de las células NK y NKAe de pacientes y se pudo comprobar que las NKAe presentaban un fenotipo altamente citotóxico con sobreexpresión de los receptores NKG2D y NKp30 y que, además, estos receptores realizaban una contribución importante en la citotoxicidad de las NKAe ya que su capacidad citotóxica frente a células de MM y frente a células clonogénicas se vio reducida mediante previo bloqueo de estos receptores con anticuerpos monoclonales.

Por otra parte, se puso a punto la detección de la *side population* de MM, ya que esta población celular muestra resistencia a fármacos, mediante expulsión a través de sus transportadores ABC de membrana, característica propia de la célula madre tumoral. Se detectó esta población en todas las muestras analizadas, aunque su proporción era variable y generalmente escasa, tanto en líneas celulares de MM como en células de MM primarias. El único compuesto capaz de inhibir la capacidad de las células de la *side population* de MM para expulsar fármacos fue la reserpina. El análisis por secuenciación masiva de transcriptoma completo mostró que la *side population* de MM sobreexpresaba genes implicados en el metabolismo de células madre, respecto al resto de células tumorales. Además, el inmunofenotipo de ligandos de membrana para receptores de células NK reveló que éstos muestran el mismo nivel de expresión en células *side population* que en el resto de células tumorales, siendo susceptibles a la citotoxicidad directa de las células NKAe. Se corroboraron estos hallazgos mediante microscopía *in vivo* observándose que las células NKAe eran capaces

de destruir las células de la *side population* del mismo modo que el resto de células de MM. Sin embargo, no destruyen la célula madre hematopoyética sana CD34<sup>+</sup>.

Se realizó un ensayo clínico fase I de prueba de concepto para evaluar la seguridad de infusiones repetidas de células NKAE en pacientes con MM refractario (NCT02481934). Se realizó la producción de células NKAE a escala clínica y se incluyeron 5 pacientes. A partir de una cantidad de  $20,82 \cdot 10^6$  células NK se obtuvo un número de células NKAE 45 veces superior sin contaminación de linfocitos T. Se observó que estas células NKAE no presentaban potencial oncogénico. Asimismo, no se produjo ninguna toxicidad en los pacientes más que una moderada neutropenia relacionada con el tratamiento antineoplásico. Los 5 pacientes incluidos mostraron estabilización de la enfermedad o respuesta parcial debida exclusivamente a la adición de células NKAE sin ninguna otra modificación de su tratamiento antineoplásico. Las células NKAE infundidas fueron detectadas en sangre periférica tras infusión ya que se apreció el inmunofenotipo altamente citotóxico, un aumento del porcentaje relativo de células NK tanto por citometría de flujo como por tinción citológica y un aumento de IFN- $\gamma$  en suero. No se detectaron mecanismos compensatorios que produjesen una regulación negativa de las células NKAE infundidas salvo un ligero aumento de interleuquina-10 en suero cuyo significado clínico no está determinado.

Por lo tanto, las células NKAE procedentes de los propios pacientes con MM poseen una elevada capacidad citotóxica frente a MM inclusive frente a células con características propias de células madre, como la célula tumoral clonogénica o la célula tumoral resistente a tratamiento farmacológico. Asimismo, es factible realizar múltiples infusiones consecutivas de células NKAE sin toxicidad asociada. Finalmente, esta terapia ha resultado ser eficaz en pacientes con MM refractario, por lo que estos hallazgos sientan las bases para el desarrollo de esta terapia celular autóloga con células NKAE en MM refractario.

// Summary



Multiple myeloma (MM) is characterized by an excess of plasma cells in bone marrow that synthesize high amounts of monoclonal protein. This causes bone destruction, kidney damage, and immunosuppression. New anti-myeloma drugs have greatly improved the prognosis of the disease, but it remains an incurable disease because these drugs do not destroy the MM stem cell, which shows drug resistance and/or proliferative potential. Patients with MM have a dysregulation of the immune system that may be at the basis of the initial development of the disease. The most advanced therapies against MM are focussed on the enhancement and stimulation of the immune system. Among them, cell therapy could produce this effect by exerting a direct cytotoxic action and in turn stimulating other immune cells to produce a greater immunological response. Natural killer (NK) cells are suitable candidates for this task as they are able to trigger a cytotoxic response at the first contact with the tumor antigen, they can activate cell apoptosis pathways and produce cytokines that activate B cells, T cells and dendritic cells. This work has explored the possibility of *ex vivo* activation and expansion of autologous NK cells from MM patients to evaluate their *in vitro* cytotoxicity as well as their safety and efficacy *in vivo* in the context of a clinical trial.

Thus, on the one hand, it was observed that NK cells from MM patients were not able to destroy MM cells and, specifically, MM proliferative or clonogenic cells, with the same efficiency as NK cells from healthy donors. Expansion of these NK cells from patients was performed by co-culture with the modified line K562-mb15-41BBL. After 21 days, starting from  $11,74 \cdot 10^6$  NK cells, a 16-fold higher number of activated and expanded NK cells (NKAEs) was obtained without excessive proliferation of  $CD3^+$  T cells. It was further observed that these NKAe cells had a potent cytotoxic activity *in vitro*, even against clonogenic tumor cells, even greater than NK cells activity from both patients and healthy donors. The membrane receptor immunophenotype of the NK and NKAe cells from patients was performed and it was found that NKAe had a highly cytotoxic phenotype with overexpression of the NKG2D and NKp30 receptors and that, in addition, these receptors made an important contribution to the NKAe cytotoxicity since its cytotoxic activity against MM cells and against clonogenic cells was reduced by previous blockade of these receptors with monoclonal antibodies.

On the other hand, detection of the MM side population was established, as this cell population shows resistance to drugs, by expulsion through its membrane ABC transporters, characteristic of the tumor stem cell. This population was detected in all analyzed samples although their proportion was variable and generally scarce, both in MM cell lines and in primary MM cells. The only compound capable of inhibiting the ability of MM side population cells to extrude drugs was reserpine. Analysis by next generation sequencing of whole transcriptome showed that the MM side population overexpressed genes involved in stem cell metabolism, when compared to the rest of tumor cells. In addition, the immunophenotype of membrane ligands for NK cell receptors revealed that they exhibit the same level of expression in side population cells as in the rest of tumor cells, being susceptible to direct cytotoxicity of NKAe cells. These findings were corroborated by *in vivo* microscopy by observing that NKAe cells were able to destroy the cells of the side population in the same way as the rest of MM cells. However, they do not destroy the healthy  $CD34^+$  hematopoietic stem cell.

A proof of concept phase I clinical trial was performed to evaluate the safety of multiple infusions of NKAe cells in patients with refractory MM (NCT02481934). NKAe cells were

produced at clinical scale and 5 patients were included. An amount of  $20,82 \cdot 10^6$  NK cells resulted in a 45-fold higher number of NKAE cells without T cell contamination. These NKAE cells were found to have no oncogenic potential. Also, no patient toxicity occurred other than moderate neutropenia related to antineoplastic therapy. The 5 patients included showed disease stabilization or partial response due exclusively to the addition of NKAE cells without any further modification of their antineoplastic treatment. Infused NKAE cells were detected in peripheral blood after infusion as the highly cytotoxic immunophenotype was appreciated, an increase in the relative percentage of NK cells by flow cytometry as by cytological staining and an increase of IFN- $\gamma$  in serum. No compensatory mechanisms that could produced a negative regulation of the infused NKAE cells were detected except for a slight increase of interleukin-10 in serum, whose clinical significance has not been determined.

Therefore, NKAE cells from patients with MM have high cytotoxic activity against MM even against cells with stem cells characteristics, such as clonogenic tumor cell or the tumor cell resistant to pharmacological treatment. Also, it is feasible to perform multiple consecutive infusions of NKAE cells without associated toxicity. Finally, this therapy has proved to be effective in patients with refractory MM, so these findings provide the basis for the development of this autologous cellular therapy with NKAE cells in refractory MM.

// Introducción





## 1. MIELOMA MÚLTIPLE

### 1.1. Definición y aspectos generales

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia de células plasmáticas (CP) (Kyle, 1990) que se engloba dentro de las gammapatías monoclonales malignas. Se le denomina comúnmente como “mieloma” o “mieloma de células plasmáticas”. El adjetivo “múltiple” se añade ya que afecta a múltiples huesos y áreas del organismo. Se caracteriza por una acumulación descontrolada de células plasmáticas patológicas en médula ósea (MO). Estas CPs producen y secretan una inmunoglobulina (Ig) anormal de carácter monoclonal, generalmente IgG o IgA, que se denomina proteína monoclonal o pico M, llamado así debido al aspecto que muestra cuando es detectado mediante electroforesis. El pico M puede estar constituido por una inmunoglobulina completa o por un fragmento de ésta (las cadenas ligeras kappa o lambda). El exceso de esta proteína se secreta en sangre periférica (SP) y/o en orina. Además, se produce un exceso de cadenas ligeras que no se combinan con las cadenas pesadas. Este exceso de cadenas ligeras se denomina Bence-Jones, éstas poseen un peso molecular lo suficientemente bajo como para pasar libremente a la orina (Rajkumar and Kyle, 2005).

### 1.2. Epidemiología

El MM constituye el 1% de todas las neoplasias malignas así como el 10% de los cánceres hematológicos, siendo el segundo cáncer hematológico después del linfoma (Kyle and Rajkumar, 2008). Su incidencia en Europa es de 4,5 – 6 casos/100.000 habitantes/año con una mediana de edad al diagnóstico entre 65 y 70 años (Moreau et al., 2013). Los casos de MM en edades inferiores a las descritas son minoritarios. Únicamente un 12% de los pacientes diagnosticados son menores de 50, y sólo un 2% es menor de 40 años (Blade et al., 1996b). El MM por debajo de los 30 años es prácticamente inexistente constituyendo sólo el 0,02% - 0,3% de los casos totales. En total, los casos de MM en menores de 65 años constituyen un 37% (Blade et al., 1996a, Blade and Kyle, 1998). La incidencia es variable, observándose una menor incidencia en la población asiática (Chen et al., 2016) y una mayor incidencia en la población de los

países occidentales más industrializados. El MM es más común en el género masculino que en el femenino (ratio 1,44:1), aunque sin grandes diferencias, y en la población de descendencia africana.

La mortalidad es de 4,1 casos/100.000 habitantes/año. La mayoría de casos se desarrollan a partir de un estadio premaligno y asintomático denominado gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) a una tasa de 1% al año (Kyle et al., 2006). En algunos casos, los pacientes son diagnosticados en un estadio más avanzado de la enfermedad, aún asintomático, que se denomina mieloma múltiple indolente. Este mieloma indolente evoluciona a MM una tasa de 10% al año en los primeros 5 años desde el diagnóstico. Esta tasa se reduce a 3% al año en los siguientes 5 años y a 1,5% en los años posteriores (Moreau et al., 2013). La probabilidad acumulada de recaída tras 15 años es del 73% (Kyle et al., 2007).

Pese a que en los últimos años los tratamientos de nueva generación han mejorado considerablemente la supervivencia de los pacientes con MM, esta mejora sigue siendo muy variable debido a la heterogeneidad de la respuesta al tratamiento. Uno de esos factores que influyen en la respuesta es la edad, que constituye un factor pronóstico en MM (Chretien et al., 2014). En pacientes con una edad media de 65 años la supervivencia global es de 4-6 años. En cambio, en pacientes jóvenes es de 10 años (Smith and Yong, 2016). A nivel mundial, el MM fue responsable de 74000 muertes en el año 2010 frente a las 49000 que suponía en 1990 (Lozano et al., 2012) y posee una prevalencia a 5 años de 270000 casos (Kazandjian, 2016).

### 1.3. Etiología

Las causas del MM no se encuentran establecidas. Seguramente, su aparición debe poseer un origen multifactorial. Si bien, existen evidencias de que la exposición a radiaciones ionizantes y químicos carcinógenos podría favorecer el desarrollo de MM (Schull, 1983). Algunos estudios sugieren que existe una mayor incidencia del MM en los supervivientes a bombas nucleares o en los trabajadores de recintos nucleares (Shimizu et al., 1990). También se ha sugerido la relación con la exposición a herbicidas y

pesticidas de ciertas profesiones agrícolas (Gallagher et al., 1983, Blair and Zahm, 1991). Sin embargo, se necesitan evidencias a largo plazo para confirmar esta hipótesis.

Dada la variabilidad de la incidencia en función del género y de la raza, además de la existencia de casos de MM familiar (Loth et al., 1991), cabe pensar en la posibilidad de la existencia de una predisposición genética. Diversos autores han demostrado una asociación familiar con GMSI y MM (Landgren et al., 2006).

Otros factores se han postulado como desencadenantes del MM como por ejemplo la obesidad (Landgren et al., 2010).

Se ha sugerido también que una exposición inmune prolongada, que conllevaría una estimulación antigénica crónica, podría relacionarse con el desarrollo de MM. Existen estudios que describen una relación con enfermedades inflamatorias como neumonía o alergias, pero se han encontrado mayores evidencias de asociación entre la artritis reumatoide y el MM (Isomaki et al., 1978, Eriksson, 1993). También se ha descrito una asociación con la Leishmaniosis, la infección por citomegalovirus (Haas et al., 1990) o con la hepatitis C (Sanchez, 1995). Pese a ello, los datos no son consistentes a lo largo de los diferentes estudios. Hay que tener en cuenta que los pacientes con MM poseen una disfunción del sistema inmune, lo que predispone a sufrir infecciones.

Actualmente se sabe que la desregulación del sistema inmune es un factor importante en el MM. Se asocia con un aumento en la incidencia de infecciones que constituyen una causa principal de morbilidad y mortalidad en MM. Además la inmunodeficiencia presente en MM posee un impacto directo sobre la progresión de la enfermedad y la resistencia a fármacos (Borrello, 2012). Los pacientes con MM muestran menores niveles de células NK, linfocitos B y células T de memoria, así como de Igs no clonales (Schutt et al., 2006). También se han detectado irregularidades en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en pacientes con MM sobre todo en estadios avanzados de la enfermedad, incluyendo una reducción de los marcadores de superficie asociados con la señalización de las células T (como CD28 y CD137), errores en la activación inducida por citoquinas y en la transducción de señales (Mozaffari et al., 2004). Asimismo, se han encontrado defectos en las células NKT (Dhodapkar et al., 2003) así como en células

dendríticas (Ratta et al., 2002) e incluso en la diferenciación y activación de linfocitos B (Rawstron et al., 1998).

#### 1.4. Patogenia

En el desarrollo normal, las células B, tras un primer contacto con el antígeno, proliferan y se diferencian. Se produce una primera respuesta inespecífica mediante la diferenciación de los linfoblastos a células plasmáticas pre-germinales, de vida corta y receptores de baja afinidad con isotipo IgM (Calame et al., 2003). Éstas constituirían la base de los casos de MM con isotipo poco habitual IgM (Gonzalez et al., 2007). El resto de linfoblastos activados pueden ir al centro germinal y sufrir los procesos de hipermutación somática y selección antigénica. Las células post-centro germinal, que poseen receptores de alta afinidad, que hayan sufrido el proceso de cambio de clase, regresan a MO donde residen como células plasmáticas no proliferativas de larga vida (Calame, 2001). Las células de MM presentan reordenamientos cuyas hipermutaciones somáticas no muestran variaciones intraclonales, lo que indica que la expansión clonal se produce en células post-germinales (Bianchi and Munshi, 2015).

El evento inicial que da lugar al desarrollo de la célula tumoral en MM es desconocido a día de hoy. Estudios realizados por varios grupos han demostrado la existencia de unas células B, tanto en MO como circulantes en SP, que no han sufrido el cambio de clase y que son clonalmente idénticas a las células de MM, denominadas células B clonotípicas (Szczeppek et al., 1998, Boucher et al., 2012). Éstas no expresan los marcadores típicos de la célula de MM, pero sí que expresan CD20 e Ig de superficie lo que indicaría que el origen del MM podría encontrarse en células B que no han sufrido cambio de clase, pero sí mutación somática (Tarte et al., 2002).

Se han descrito múltiples mutaciones que se han detectado en la mayor parte de los casos de MM, aunque su importancia y su lugar en el desarrollo de la patología aún está por confirmar. La teoría inicialmente aceptada del desarrollo de MM implicaría la acumulación secuencial de mutaciones en la célula plasmática, ahora se sabe que el mieloma no sólo posee una evolución secuencial si no también clonal por lo que no todas las mutaciones se irían acumulando en un único clon. El MM se caracteriza en

muchas ocasiones por la presencia de mutaciones en KRAS (sobre todo en pacientes que han sido previamente tratados), NRAS, BRAF, FAM46C, TP53, DIS3 y MYC. Además, generalmente se observan mutaciones en proteínas implicadas en las mismas vías de señalización, como ocurre con KRAS, NRAS y BRAF (Lohr et al., 2014). Las mutaciones más comunes incluyen pérdidas a nivel del 1p e inactivación de p53 lo que se traduce en un exceso de producción de Igs (Furukawa and Kikuchi, 2015). También se han descrito mutaciones en los genes de algunas enzimas implicadas en la modificación de histonas como MLL, MLL2, MLL3, UTX, MMSET y WHSC1L1 (Lawasut et al., 2013).

Las mutaciones somáticas pueden clasificarse en no hiperdiploides o hiperdiploides (Chng et al., 2006). Tanto las mutaciones no hiperdiploides como las hiperdiploides conllevan una desregulación de las fases G1/S del ciclo celular y de la ciclina D (Walker et al., 2010, Hengeveld and Kersten, 2015). Los MM no hiperdiploides se caracterizan por translocaciones cromosómicas en 14q32, como son la t(4;14), t(11;14), t(14;16) y la t(14;20). Esto supone translocaciones tempranas en los genes de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IgH) y una elevada expresión de IgH detectada en la clínica (Chubb et al., 2013). Este tipo de MM se correlaciona con progresión de la enfermedad y mal pronóstico (Pawlyn et al., 2015). En cambio los MM hiperdiploides se caracterizan por la presencia de trisomías sobre todo en los cromosomas, 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 y 21. A nivel clínico, este tipo de MM muestra un exceso de ciclina D pero no de IgH (Alexander et al., 2007).

La progresión del MM se encuentra también muy ligada al microambiente medular. Éste es un nicho muy dinámico con capacidad de reparar el daño que se produce y de responder a mediadores inflamatorios y señales endocrinas. El microambiente de la MO es un modelador principal de la malignización de las células plasmáticas (Reagan and Rosen, 2016). Además de servir de sustento a las células de MM, el estroma medular también aporta mediadores inflamatorios como interleuquina-6 (IL-6), IGF-1, VEGF, factor de necrosis tumoral-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y CXCL12 (éste último esencial para el anidamiento de las CPs en MO), secretados por las células estromales de MO, macrófagos y neutrófilos. La interacción de las células de MM con el estroma estimula la sobreexpresión de IL-6 que estimula la proliferación de células de MM y la prevención de la apoptosis (Dankbar et al., 2000, Mitsiades et al., 2006). Además la presencia de

moléculas de adhesión celular, como CD44, CD56, VLA-4 y CD138 entre otros, posee un papel crucial favoreciendo el anidamiento de las células de MM en MO (Teoh and Anderson, 1997).

### 1.5. Fisiopatología y clasificación del mieloma múltiple

El MM comienza con un estado asintomático premaligno, que puede mantenerse invariable durante años, que es la GMSI. La GMSI se caracteriza por el crecimiento no excesivo de células plasmáticas en MO sin producir destrucción ósea ni daño orgánico (Figura 1). Sin embargo, se ha descrito que en ese momento del desarrollo de la enfermedad ya existen ciertas alteraciones óseas debidas a la pérdida del equilibrio entre la actividad osteoclástica y la osteoblástica. De hecho, estudios preliminares exploran la posibilidad de retrasar la evolución de GMSI a MM mediante tratamiento de la pérdida ósea que se produce en GMSI (Fairfield et al., 2016).

La progresión de la enfermedad se produce por la acumulación de mutaciones en las células de mieloma. En ausencia de síntomas clínicos, cuando aumenta el componente monoclonal (pico M) en suero y el porcentaje de CPs en MO supera el 10%, encontrándose en un rango de 10% - 60%, la GMSI pasa a convertirse en MM indolente o MM “*smoldering*”. Éste es un estado intermedio entre la GMSI y el MM sintomático.

El aumento del número de mutaciones, como aquellas que afectan a la familia de genes RAS, junto con la desregulación del sistema inmune y modificaciones del estroma medular favorecen la evolución de la enfermedad a MM activo o sintomático. Las características del MM activo se detallan en la tabla 1.

Designación	Definición
GMSI	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pico M presente en suero &lt; 3 g/dL</li> <li>• CPs clonales en MO &lt; 10%</li> <li>• Ausencia de síntomas clínicos</li> </ul>
Mieloma indolente	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento del pico M <math>\geq</math> 3 g/dL y/o CPs clonales en MO <math>\geq</math> 10%</li> <li>• Ausencia de síntomas clínicos</li> </ul>
Mieloma activo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pico M en suero y/u orina</li> <li>• CPs clonales en MO <math>\geq</math> 60% (90% con fenotipo patológico por citometría de flujo)</li> <li>• Sintomatología derivada de la afectación orgánica (CRAB)</li> </ul>
Leucemia de células plasmáticas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Presencia de CPs patológicas en sangre periférica &gt; 20%</li> </ul>
Criterios CRAB: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hipercalcemia: calcio &gt; 11,5 mg/dL</li> <li>• Insuficiencia renal: creatinina &gt; 2 mg/dL</li> <li>• Anemia: hemoglobina &lt;10 g/dL o disminución de 2 g/dL respecto al límite inferior de normalidad</li> <li>• Lesión ósea: lesiones líticas u osteoporosis con fracturas que produzcan compresión</li> <li>• Otros: hiperviscosidad, infecciones recurrentes (&gt;2 episodios en 1 año)</li> </ul>	

Tabla 1. **Etapas de desarrollo del mieloma múltiple.** En la tabla se esquematizan las diferentes fases de desarrollo de la enfermedad desde GMSI hasta la leucemia de células plasmáticas (LCP) indicándose las características clínicas y analíticas de cada etapa, como la presencia de sintomatología CRAB de calcio, insuficiencia renal, anemia y lesiones óseas (**C**alcium, **R**enal insuficiency, **A**nemia or **B**one lesions).

Los pacientes con MM activo presentan fatiga y dolor óseo, signos iniciales del MM. Una de las características principales del MM activo es la aparición de sintomatología relacionada con la aparición de daño tisular u orgánico identificada con el acrónimo CRAB. Los pacientes con MM pueden presentar hipercalcemia debido a la liberación de calcio que se produce desde el hueso por la elevada actividad osteoclástica. Estos pacientes presentan debilidad ósea y susceptibilidad a fracturas (Kyle et al., 2003). La destrucción ósea es propiciada por la desregulación del eje RANK/RANKL/OPG encargado en condiciones fisiológicas de mantener el equilibrio entre remodelación y resorción ósea (Roodman and Dougall, 2008). Así se favorece la



liberación de factores de crecimiento hacia la matriz medular lo que promueve la progresión del MM y la colonización de la MO por parte de las células plasmáticas patológicas. Este proceso tiene como resultado el aumento de la actividad osteoclástica cerrando así el ciclo (Fowler et al., 2011). A su vez, el estroma medular participa activamente, se remodela para favorecer la liberación de factores de crecimiento por parte de los neutrófilos y los macrófagos, ayudando así a la propagación del MM (Kastritis et al., 2009). En este punto, las células de MM colonizan prácticamente por completo la MO. La proporción del resto de progenitores hematopoyéticos sanos se ve disminuida lo que conlleva una menor proporción de eritrocitos y de leucocitos. Por este motivo, los pacientes con MM suelen presentar anemias pronunciadas y un estado de inmunodepresión generalizado que les hace muy susceptibles a infecciones oportunistas. Además, el exceso de cadenas ligeras libres en SP se desplaza por el torrente sanguíneo pudiendo alcanzar el glomérulo renal. Una vez allí, pueden formar precipitados y causar daño tubular y posterior insuficiencia renal (International Myeloma Foundation, 2016).

El MM sintomático puede clasificarse (tabla 2) mediante el Sistema de Estadificación Internacional Revisado (Revised International Staging System [R-ISS]) establecido por el International Myeloma Working Group (IMWG) que define diferentes tipos de MM sintomático según los niveles de  $\beta_2$ -microglobulina (indicador inespecífico de enfermedad tumoral) en SP, los niveles de albúmina sérica, y el nivel de riesgo evaluado en función de la presencia de mutaciones de riesgo detectadas mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH) y los niveles de lactato deshidrogenasa (LDH).

Estadio	Criterio
I	<ul style="list-style-type: none"> <li>• B<sub>2</sub>-microglobulina sérica &lt; 3,5 mg/L</li> <li>• Albúmina sérica ≥ 3,5 g/dL</li> <li>• Riesgo estándar: niveles de LDH normales y citogenética de riesgo estándar por FISH</li> </ul>
II	No I ni III
A	<ul style="list-style-type: none"> <li>• B<sub>2</sub>-microglobulina sérica &lt; 3,5 mg/L</li> <li>• Albúmina sérica &lt; 3,5 g/dL</li> </ul>
B	<ul style="list-style-type: none"> <li>• B<sub>2</sub>-microglobulina sérica entre 3,5 y 5,5 mg/L</li> </ul>
III	<ul style="list-style-type: none"> <li>• B<sub>2</sub>-microglobulina sérica ≥ 5,5 mg/L</li> <li>• Alto riesgo: LDH elevada y/o citogenética de alto riesgo por FISH</li> </ul>

Tabla 2. **Sistema de estadificación internacional revisado.** El mieloma múltiple se clasifica en 3 tipos basados en el sistema de estadificación internacional diseñado para sustituir la clasificación Durie/Salmon (Greipp et al., 2005). Recientemente, el ISS ha sido sustituido por el R-ISS que asocia también el riesgo medido por citogenética mediante FISH y por los niveles de LDH en sangre periférica. Así se clasifican en alto riesgo si los niveles de LDH se encuentran por encima de la normalidad y si presentan alteraciones cromosómicas de riesgo como delección del 17p, translocación t(4;14) o translocación t(14;16) (Palumbo et al., 2015, Smith and Yong, 2016).

Finalmente, el MM desarrolla técnicas de evasión, debidas a la evolución clonal, y mecanismos de resistencia a fármacos. En este punto el MM evoluciona a un estadio terminal agresivo totalmente independiente de la MO denominado leucemia de células plasmáticas (tabla 1). Las células plasmáticas extravasan la MO para diseminarse por el torrente sanguíneo. Por este motivo, se produce un aumento de la proporción de células plasmáticas en SP constituyendo más del 20% (Barlogie et al., 2004, Grivennikov et al., 2010).

#### 1.6. Evolución clonal del mieloma múltiple

Gracias a las nuevas técnicas que permiten realizar estudios genómicos de alta resolución se sabe que existe mucha heterogeneidad mutacional dentro del MM, ya que no existe una única mutación común en todos los casos de MM, pese a que se han detectado variantes recurrentes (Egan et al., 2012, Dhakal et al., 2016). Inclusive la heterogeneidad intraclonal tampoco es uniforme en todos los casos así como en diferentes poblaciones de células de MM, lo que supone un enorme reto a la hora del

tratamiento en cuanto a la resistencia a fármacos (Morgan et al., 2012, Roccro et al., 2013).

Actualmente, el MM sigue siendo una enfermedad incurable. Esto se debe a que los fármacos anti-mieloma empleados no consiguen eliminar por completo las células responsables de la progresión del tumor. La enfermedad comienza, como ya se ha comentado anteriormente, con la GMSI que puede mantenerse durante mucho tiempo o puede evolucionar a MM indolente y posteriormente a MM activo, objetivándose un aumento del pico M en SP y de los síntomas clínicos. Los pacientes con MM activo experimentan fases de remisión de la enfermedad que coinciden con la respuesta al tratamiento antineoplásico de elección (figura 1). Estas fases de remisión pueden ser indefinidas, pero en la mayoría de casos, se producen recaídas en las que la enfermedad progresa. Estos periodos de recaída/remisión se repiten a lo largo del tiempo, pero en cada uno de ellos la remisión de la enfermedad nunca alcanza los niveles iniciales. En cada recaída el paciente recibe un tratamiento diferente al recibido con anterioridad. Finalmente, el MM se convierte en refractario y no responde al tratamiento culminando con el fallecimiento del paciente.

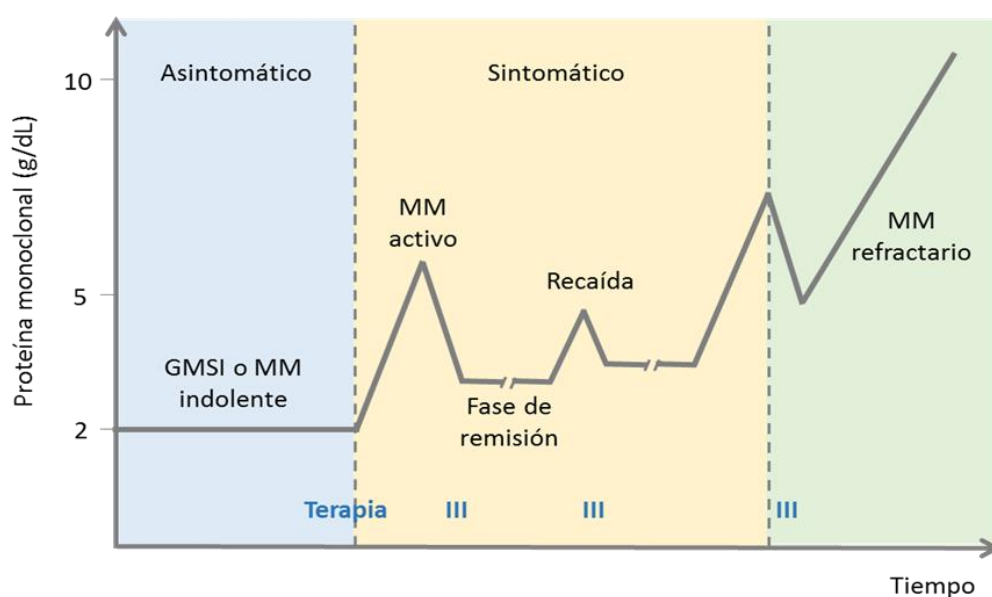


Figura 1. **Evolución del mieloma múltiple.** Adaptado de la International Myeloma Foundation, 2016.

En contraposición con lo que se postuló hace varias décadas, el MM no se desarrolla a partir de una evolución secuencial de una célula iniciadora de tumor que va acumulando mutaciones, si no que posee una evolución clonal en ramas. Esto significa que la célula iniciadora de tumor adquiere mutaciones que transmite a sus células hijas, pero éstas pueden a su vez adquirir mutaciones distintas cada una de ellas. De modo que se generan diferentes conjuntos clonales de células tumorales que albergan una inmensa diversidad genética. De este modo, varios escenarios serían posibles en el desarrollo del MM (figura 2):

- (A) Durante la progresión desde GMSI hasta MM, las células iniciadoras de tumor pueden dar lugar a un subclón, con una mutación única, x, que es detectado al diagnóstico como el clon mayoritario y que también puede mantenerse como el clon mayoritario tras el tratamiento y producir una recaída.
- (B) Otro escenario posible, que podría corresponderse con MM de alto riesgo, es aquel en el que aparece un subclón, minoritario al diagnóstico y por tanto no detectado, que habría adquirido una mutación propia distinta al del subclón dominante, xy, durante la terapia. La terapia antineoplásica podría haber eliminado el subclón dominante con mutación x, por lo que el subclón xy pasaría a ser el clon dominante produciendo la recaída.
- (C) En un último escenario, un subclón derivado de las células iniciadoras de tumor con una mutación, z, presente al diagnóstico, podría encontrarse en estado latente desde el inicio de la enfermedad y no sería detectado al diagnóstico. De manera espontánea podría abandonar el estado de latencia tras el tratamiento que habría eliminado el resto de clones, para convertirse en el clon mayoritario y producir la recaída.

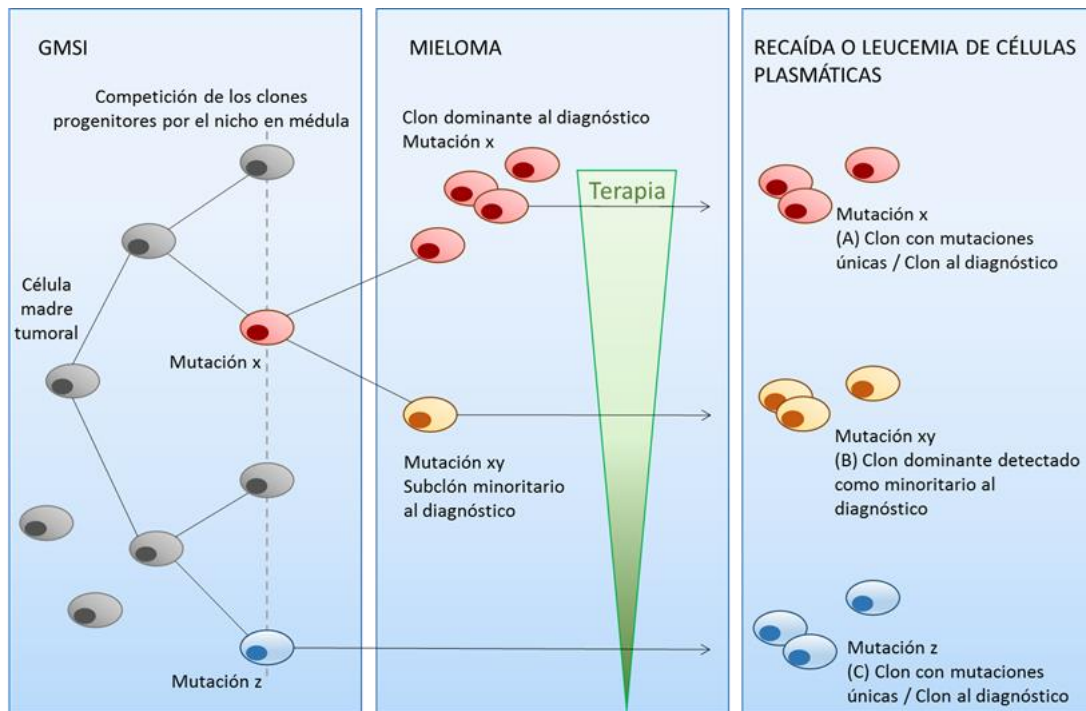


Figura 2. **Evolución y composición clonal del mieloma múltiple durante la progresión y terapia.** La figura esquematiza los posibles escenarios del desarrollo clonal del MM. Adaptado de Röllig, C., Knop, S. y Bornhäuser, M. 2015.

Los casos de MM cuya evolución clonal se corresponda con aquella en la que los clones dominantes poseen mutaciones únicas presentes desde el origen de la enfermedad son más susceptibles a la terapia agresiva. En cambio, aquéllos en los que los clones dominantes posean mutaciones adquiridas durante tratamiento serán más resistentes a la terapia convencional (Röllig et al., 2015). De este modo, el estudio de los subclones presentes en cada paciente podría constituir un factor pronóstico de MM.

## 1.7. La célula plasmática

### 1.7.1. Identificación y caracterización de la célula plasmática

La célula plasmática representa el último estadio madurativo del linaje de células B. Las moléculas que se expresan en su superficie han sido ampliamente estudiadas mediante citometría de flujo multiparamétrica (CMF). Esta técnica ha permitido además establecer el perfil de expresión propio de las células plasmáticas sanas y de las células plasmáticas patológicas de MM facilitando su diferenciación. A continuación, se detallan

las moléculas, consideradas relevantes en el contexto de este trabajo, presentes en células plasmáticas, clasificadas por grupos funcionales:

- Diferenciación y maduración:
  - CD38: esta molécula es una ectoenzima implicada en adhesión celular, transducción de señales y señalización mediada por calcio (Quarona et al., 2013). Dentro del sistema hematopoyético CD38 se encuentra ampliamente distribuido desde las células CD34+. Su expresión es variable a lo largo del desarrollo de células B, disminuyendo hasta negativizarse en linfocitos B naive y aumentando en linfocitos B activados (Quijano et al., 2008). Las CPs son las células con mayor expresión de CD38, marcador que permite su identificación (Orfao et al., 1994). En la mayoría de los casos la célula de MM expresa CD38 de manera más débil que la CP sana (Mateo Manzanera et al., 2005).
  - CD19: es el marcador común de las células B. Se encuentra implicado en la diferenciación y activación de las células B. En MM las CPs patológicas son negativas para este marcador mientras que las CPs sanas sí que lo expresan (Ruiz-Arguelles and San Miguel, 1994).
  - CD45: es una glicoproteína de membrana conocida como el antígeno leucocitario común. Se expresa en la membrana de todas las células hematopoyéticas salvo eritrocitos y plaquetas. Posee actividad tirosin fosfatasa cuya señalización se encuentra implicada en crecimiento celular, diferenciación y ciclo celular. En la CP disminuye su intensidad, y en el caso de CPs de MM se observa una intensidad muy baja de CD45 (Kim et al., 2012).
- Adhesión:
  - CD138: también denominado sindecano-1 es una glicoproteína de superficie que promueve la adhesión de las CPs al colágeno tipo I y a la fibronectina. Se expresa en CPs tanto sanas como patológicas. Aunque su expresión no es demasiado elevada siempre se ha considerado exclusiva de las CPs (Wijdenes et al., 1996). Actualmente se ha demostrado que algunas poblaciones mieloides muestran cierta autofluorescencia o marcaje inespecífico para CD138 (Flores-

Montero et al., 2016). Otros también han demostrado la reducción de la expresión de CD138 en muestras recogidas en tubos de heparina, ya que ésta afecta a la disponibilidad del epítipo al realizar el marcaje (Yang et al., 2003b).

- CD56: esta glicoproteína también se conoce como NCAM (*Neural cell adhesion molecule*) y forma parte de la superfamilia de las Igs. Se encuentra implicada en adhesión de manera homofílica o heterofílica mediante unión al heparán sulfato. Se expresa en células NK, NKT y en CPs sanas. En el caso de células de MM es positivo en un 60% de los casos (Van Camp et al., 1990, Van Riet et al., 1991). Suele ser negativo en LCP por lo que CD56 podría constituir un factor pronóstico de la enfermedad (García-Sanz et al., 1999).
  - SLAMF7: también denominado CS1 o CD319, es una glicoproteína de superficie de la familia de receptores SLAM que se encuentran implicados en regulación inmune. Inicialmente se describió su expresión únicamente en CPs y en un pequeño subconjunto de células T y Natural killer (NK) (Tai et al., 2009). Recientemente se ha descrito que podría ser utilizado para sustituir CD138 en la identificación de CPs. Otros miembros de esta familia como SLAMF1, 2, 3 y 6, se encuentran bajo estudio ya que se ha detectado su expresión en MM (Muccio et al., 2016).
  - Otras moléculas implicadas en adhesión y que poseen un papel importante en la interacción de las células de MM con el estroma medular son las de la familia de las integrinas: como VLA-5 (CD49e) y VLA-4 (CD49d) que promueve la síntesis de IL-6 cuyos efectos sobre la progresión del MM ya se han descrito (St Croix et al., 1996). LFA-1 (también conocida como CD18) se encuentra presente en todos los leucocitos y participa en la adhesión al estroma medular mediante interacción con ICAM-1.
- Receptores de citoquinas:
- CD117: o c-Kit, es un receptor para el *stem cell factor* o el ligando de c-Kit. Es una proteína tirosin quinasa, la unión a su ligando estimula la proliferación y supervivencia de las células hematopoyéticas y en mastocitos, en los cuales se

expresa. En MM se ha detectado en un 30% de los casos (Ocqueteau et al., 1996, Kraj et al., 2004).

- Otros:

En un 20% de los casos de MM se ha detectado la expresión de CD20 y en mayor medida en LCPs. Este es un marcador específico del linaje B y no se expresa en CPs sanas (Craig and Foon, 2008). CD28, marcador de células T, forma parte de la superfamilia de las Igs en su activación, es una molécula co-estimuladora que induce la activación de linfocitos T y la síntesis de interleuquina-2 (IL-2) (Greenfield et al., 1998). En MM se ha detectado su expresión parcial, su función dentro de la patología es desconocida, aunque se asocia con progresión de la enfermedad (Robillard et al., 1998). En MM también se ha detectado la pérdida de expresión de CD27, éste es miembro de la superfamilia de los receptores TNF y se expresa en células en estado maduro como CPs sanas (Avery et al., 2005).

Las células de MM pueden diferenciarse fácilmente de las CPs sanas mediante CMF. Mientras que las CPs sanas son CD38<sup>+</sup>/CD138<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>/CD56<sup>-</sup>, la población de CPs patológicas puede definirse como CD38<sup>+</sup>/CD138<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD19<sup>-</sup>/CD56<sup>+/-</sup> y en algunos casos también serían CD20<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>. La detección mediante SLAMF7 aún no se ha estandarizado, pero podría ser un candidato dado que la expresión en células de MM es muy elevada (Muccio et al., 2016, Pojero et al., 2016).

### 1.7.2. Identificación de la célula madre de mieloma múltiple

La caracterización de la célula madre del MM y el descifrado de los mecanismos presentes en esa célula que le confieren esa ventaja y resistencia a fármacos se han convertido en uno de los mayores retos de la investigación en onco-hematología. Actualmente, no existe un consenso en cuanto a la caracterización de la célula madre de MM y muchos han sido los métodos empleados para poder discriminar esta población celular; la detección de altos niveles del enzima aldehído deshidrogenasa, detección de un marcador exclusivo de célula iniciadora de tumor, la formación de colonias o esferas, la detección de la *side population* o métodos más novedosos aún no



estandarizados como la caracterización de células autofluorescentes (Miranda-Lorenzo et al., 2014). Todos ellos con sus ventajas, pero también con ciertas carencias, sin que ninguno llegue a ser el *gold-standard* ya que ninguno ha conseguido hasta el día de hoy identificar esta población en todos los tipos de células tumorales.

- Identificación de marcadores candidatos: ciertos tumores expresan marcadores intracelulares como NANOG, OCT4, SOX2, WNT o hedgehog, aunque no todos ellos han sido detectados en todos los tipos de cáncer (Wang et al., 2013a). En cuanto a marcadores como CD133, CD44 y CXCR4, pueden caracterizar la población madre tumoral en algunos tipos de cáncer como el cáncer gástrico (Takaishi et al., 2009), pero en MM no se ha definido a día de hoy ningún marcador que discrimine esta población del resto, aunque se baraja la ausencia de CD138 como posibilidad (Lum et al., 2016, Wu et al., 2015).
- Niveles del enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH): dentro de los marcadores intracelulares, se ha descrito que las células madre tumorales presentan elevados niveles de ALDH que se correlacionan con resistencia a la terapia y fenotipo agresivo en algunos tipos de cáncer como el de esófago o el de mama (Ginestier et al., 2007, Charafe-Jauffret et al., 2013).
- Formación *in vitro* de colonias o esferas: éstos han sido los métodos más empleados en la actualidad para la identificación de células iniciadoras de tumor (Ajani et al., 2015). La formación de colonias se realiza sembrando las células en medio semisólido de metilcelulosa o en agar. Las células inmovilizadas con capacidad de autorrenovación formarán colonias visibles que estarán formadas por células con características heterogéneas pese a partir de una única célula (Hamburger and Salmon, 1977b). Por otro lado, la formación de esferas se basa en el cultivo de las células de interés, previamente aisladas o enriquecidas, en un medio específico libre de suero, con el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF). Este tipo de medio enriquece el cultivo en células iniciadoras de tumor o células madre (Prud'homme, 2012).

- Detección de la *side population*: la detección de esta población se basa en características primitivas propias de células muy conservadas como serían las células madre tumorales (Telford, 2013). En concreto se basa en la mayor presencia de bombas de membrana de la familia *ATP binding cassette* (ABC) en este tipo de células, que les otorga la capacidad de resistencia a fármacos. Al incubar las células con la sonda vital, normalmente Hoescht 33342 o Dye Cycle Violet (DCV), las células madre tendrían mayor cantidad de bombas ABC y podrán expulsar la sonda mostrando así una baja fluorescencia detectada por CMF. Existen estudios que describen que este método podría discriminar las células madre en tumores sólidos como el cáncer renal ya que estas células poseen a su vez potencial replicativo y la capacidad de regenerar toda la heterogénea población celular de partida (Addla et al., 2008, Oates et al., 2009). Inclusive se ha demostrado en enfermedades hematológicas como la leucemia mieloide aguda (Moshaver et al., 2008).

#### 1.8. Tratamiento del mieloma múltiple

La terapia frente a MM evoluciona rápidamente, sobre todo en los últimos años, en busca de la terapia que pueda erradicar la enfermedad. Debido a las recaídas los pacientes necesitan varias líneas de tratamiento basadas en diferentes moléculas para intentar cronificar la enfermedad. En los pacientes en recaída, el manejo clínico se vuelve más complicado dado que hay que tener en cuenta múltiples factores tanto de la biología de la enfermedad como del paciente (edad, comorbilidades, estado general, etc.) (Usmani and Lonial, 2014). Aun así, la aparición de los nuevos fármacos anti-mieloma, como las combinaciones de agentes citotóxicos, altas dosis de quimioterapia y el trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (TASPE) han mejorado considerablemente la supervivencia en MM. A continuación, se describen los nuevos tratamientos que se emplean en MM y los que se encuentran en desarrollo:

- Fármacos **inmunomoduladores, IMiDs**: el primer fármaco de este tipo fue la talidomida, pese a sus efectos teratogénicos en el feto, en MM produce inhibición de la angiogénesis e induce apoptosis de la neovasculatura. El

tratamiento combinado con dexametasona produce una mejora en la respuesta en un 55% (Dimopoulos and Kastritis, 2008). La nueva generación de IMiDs la constituyen la lenalidomida (LEN), y la más reciente pomalidomida más eficaces y menos tóxicas. La LEN se utiliza tanto en primera como en segunda línea y también como tratamiento de mantenimiento en MM, mientras que la pomalidomida se considera en pacientes en recaída en tercera línea o posterior (San Miguel et al., 2013). Su efecto directo sobre la célula tumoral se desconoce pero, además del efecto antiangiogénico poseen efectos antiproliferativos, antiinflamatorios vía inhibición de TNF- $\alpha$ , estimulan la inmunidad mediada por células NK y linfocitos T (Davies et al., 2001), y poseen un recién descrito efecto sobre cereblon, proteína teratogénica de unión de los IMiDs entre otros (Zhu et al., 2011).

- Fármacos **inhibidores del proteasoma**: en este grupo de fármacos se incluyen el bortezomib (BOR), del que proceden la mayoría de datos clínicos, y los derivados más novedosos como carfilzomib, ixazomib, marizomib u oprozomib, cuyo desarrollo se encuentra en fases tempranas y algunos en fase de comercialización (Nooka et al., 2015). La combinación de inhibidores del proteasoma con IMiDs y dexametasona se ha considerado como régimen de inducción apropiado previo al TASPE. Su efecto terapéutico reside en la combinación de una toxicidad directa y su efecto en el microambiente de la MO. Produce inhibición de NF- $\kappa$ B y eso se traduce en una reducción de moléculas de adhesión y citoquinas como IL-6 implicadas en el crecimiento del MM (Mitsiades et al., 2002). Lo que sigue sin estar dilucidado es por qué un efecto inespecífico de inhibición del proteasoma produce la muerte selectiva de las células tumorales (Yang et al., 2009). A su vez posee efectos opuestos sobre el sistema inmune ya que por un lado sensibiliza la célula tumoral a la acción de las células NK a través de los receptores de apoptosis (Lundqvist et al., 2006), pero también produce apoptosis de células NK y supresión de la citotoxicidad mediada por NKp46 (Wang et al., 2009, Feng et al., 2010).
- **Anticuerpos monoclonales**: la inmunoterapia basada en anticuerpos monoclonales humanizados frente antígenos asociados a tumor marca una

nueva era en el tratamiento del MM. Este tipo de terapia es mucho más dirigida y específica que todas las anteriores (Bae et al., 2014). Entre aquéllos cuya evaluación clínica se encuentra más avanzada se encuentran el elotuzumab y el daratumumab que afectan directamente a la célula tumoral. El elotuzumab (HuLuc63) es un anticuerpo que tiene como diana SLAMF7, cuya presencia en células de MM se ha descrito anteriormente. Actualmente, se encuentra aprobado su uso en segunda o posterior línea de tratamiento en combinación con lenalidomida con buenos resultados. El daratumumab actúa directamente sobre CD38. En los estudios iniciales daratumumab ha mostrado un buen perfil de seguridad y resultados alentadores en MM refractario. También se estudia su combinación con otros agentes antimieloma (Plesner et al., 2016). Otros en cambio, como el pembrolizumab o el tocilizumab ejercen su acción sobre la interacción entre el MM y el estroma (Rosenblatt et al., 2014). Concretamente, el pembrolizumab produce un bloqueo de PD-1 que es un receptor inhibidor de la actividad de las células NK cuyo ligando PD-L1 se encuentra altamente expresado en células de MM (Benson et al., 2010). Tocilizumab ejerce su efecto bloqueando el receptor de IL-6 en células de MM inhibiendo así su proliferación. Otros anticuerpos frente a múltiples dianas como CD138, CD74, VEGF o IGFR1 se encuentran en fase de desarrollo (Zagouri et al., 2016).

Por último, un paso más allá de la inmunoterapia se encuentra la terapia celular. Todos los fármacos descritos poseen actividad directa o indirecta sobre el sistema inmune de los pacientes. Dado que en MM se ha descrito la existencia de una desregulación del sistema inmune, cabe pensar que cualquier medio que favorezca la actividad de éste mismo contribuirá a una mejor respuesta del organismo frente a células aberrantes, patógenos o células tumorales, lo que justifica el desarrollo de la terapia celular en MM. La terapia celular con células del sistema inmune (inmunoterapia activa) podría aunar todos los efectos descritos, todos ellos enfocados a la destrucción de células aberrantes o tumorales mediante mecanismos de destrucción específica evitando las complicaciones y los efectos adversos de la quimioterapia convencional.

## 2. CÉLULAS NATURAL KILLER

### 2.1. Descripción

Las células NK y sus funciones fueron descritas hace ya más de 30 años. Por primera vez, en 1975, se describieron como linfocitos de mayor tamaño que los linfocitos B y T que poseían gránulos citoplásmicos distintivos. Se caracterizaron como células que mostraban capacidad citotóxica espontánea independiente de señales coestimuladoras y sin receptores que hayan sufrido reordenamientos génicos, lo que las diferencia funcionalmente de los linfocitos B y T (Herberman et al., 1975, Kiessling et al., 1975). Hoy en día, se describen como linfocitos grandes granulares positivos para CD56 y negativos para CD3 (Caligiuri, 2008).

Las células NK se desarrollan en MO a partir de un progenitor linfoide común pero el precursor propio de células NK no se encuentra completamente caracterizado en humanos. Tras su desarrollo se distribuyen ampliamente en tejidos linfoides y no linfoides como MO, ganglios linfáticos, bazo, SP, pulmones e hígado (Di Santo, 2006, Gregoire et al., 2007). Suponen alrededor de un 10% de los linfocitos circulantes en SP, pudiendo ser esta proporción variable entre 1% y 32% en función de múltiples causas pero también en condiciones fisiológicas (Pittari et al., 2010). Existen dos subpoblaciones de células NK maduras que poseen funciones complementarias. El 90% de las células NK circulantes en SP son células que presentan una expresión moderada de CD56 (CD56<sup>dim</sup>) y alta expresión de CD16. Éstas poseen una capacidad citotóxica extremadamente potente mediada por una variedad de mecanismos. El 10% restante está conformado por una población de células NK que posee mayor expresión de CD56 (CD56<sup>bright</sup>) y menor o nula de CD16. Éstas constituyen la población mayoritaria en tejidos linfoides secundarios y en zonas de inflamación donde realizan gran proliferación de citoquinas para favorecer el desarrollo de la respuesta inmune (Godfrey and Benson, 2012).

## 2.2. Función

Las células NK forman parte del sistema inmune innato. Desencadenan una respuesta espontánea desde el primer contacto con el antígeno, sin necesidad de una sensibilización previa. Poseen un papel importante y bien caracterizado en la respuesta inmune frente a infecciones y transformaciones malignas. En concreto, poseen un papel principal en infecciones víricas por citomegalovirus (Schlums et al., 2015), herpesvirus (Ornstein et al., 2013) e influenza (Schultz-Cherry, 2015). Las NKs poseen receptores específicos para los motivos virales proteicos más comunes (como la hemaglutinina), además son reclutadas al lugar de la infección mediante quimioquinas y una vez allí realizan una citotoxicidad directa mediante la secreción de perforina e IFN- $\gamma$ . Son esenciales para controlar la proliferación del virus y generar el microambiente inflamatorio necesario para desencadenar la respuesta adaptativa mediada por linfocitos T (Kannan et al., 2016).

Las células NK poseen también un papel relevante en la inmunidad frente a células tumorales mediante los mismos mecanismos descritos para la inmunidad frente a infecciones víricas. Ejercen una citotoxicidad directa sobre la célula tumoral, producen citoquinas que activan los linfocitos T, las células dendríticas y que promueven la maduración de los linfocitos B (Smyth et al., 2002). Las células tumorales, generalmente, pierden o reducen la expresión del antígeno leucocitario humano (HLA) como mecanismo de inmunoevasión, pero las células NK son capaces de detectar mediante sus receptores Ig-like (KIR) la ausencia de HLA y destruir la célula tumoral. La infiltración de células NK en tumores se ha asociado con buen pronóstico en cáncer gástrico (Ishigami et al., 2000), cáncer colorrectal (Sconocchia et al., 2011) o en carcinoma de pulmón (Villegas et al., 2002).

Entre sus funciones, las células NK mantienen la homeostasis del sistema linfoide controlando la inflamación asociada a respuesta inmune mediante destrucción de células presentadoras de antígeno y de linfocitos T activados. Lo que podría constituir un mecanismo protector en enfermedades autoinmunes. En la reproducción, constituyen el linfocito mayoritario en útero. Interactúan con células del trofoblasto

hasta la implantación en el útero y contribuyen al remodelado de la vasculatura maternal (Long et al., 2013).

Recientemente, se ha caracterizado que las células NK pueden desencadenar respuestas que se encontraban únicamente asociadas a la inmunidad adaptativa, como funciones reguladoras, además de mostrar capacidad de adaptación y memoria específica de antígeno sobre todo frente a infecciones virales (Vivier et al., 2011). En ese sentido, el estudio del papel de las células NK en la infección por citomegalovirus ha permitido entender la función adaptativa que poseen éstas en los procesos infecciosos virales (O'Sullivan and Sun, 2015). En ellos, se ha detectado que las células NK presentan un fenotipo de célula NK memoria, capacidad de expansión, activación a largo plazo y que generan mayor protección frente a infección o reinfecciones (Stevens et al., 2016).

### 2.3. Integración de señales y activación

El reconocimiento de las células diana por parte de las NK no se encuentra únicamente limitado a la detección de moléculas HLA en la superficie de la célula diana, si no que se debe a un equilibrio entre las señales activadoras y las señales inhibitoras que proceden del amplio repertorio de receptores de la célula. Así, los receptores activadores transmiten señales que indican peligro al detectar una célula tumoral que expresa en su membrana los ligandos para estos receptores, mientras que los receptores inhibidores identifican las células propias y transmiten señales que indican tolerancia evitando así la autorreactividad. La señal predominante será la que determine la decisión final de la célula NK (Lanier, 2005). Actualmente, no se conocen todos los ligandos para los receptores de células NK. Existen tres principales familias de receptores en las células NK: los receptores de citotoxicidad natural (NCR), los receptores tipo lectina C y los receptores KIR. Mientras que la familia de los NCRs contiene únicamente receptores activadores, los receptores tipo lectina C y los KIRs incluyen tanto receptores activadores como inhibidores (Cheent and Khakoo, 2009). También existen otras moléculas activadoras y moléculas coestimuladoras que participan en la actividad citotóxica de estas células.

## 2.4. Receptores de células NK

### 2.4.1. Receptores inhibidores

Los principales receptores inhibidores de las células NK son los receptores KIR, pero también existen KIR activadores. Son glicoproteínas que forman parte de la superfamilia de las Igs. Se denominan en base a su estructura y su función. La denominación “2D” o “3D” hace referencia al número de dominios de Ig extracelulares, mientras que las letras “L” o “S” diferencian si el dominio citoplásmico es largo (*long*) o corto (*short*). Los receptores KIR inhibidores poseen un dominio intracelular largo asociado a motivos inhibidores basados en tirosina (ITIM; *immunoreceptor tyrosine-based motif*). Existen 15 genes KIR funcionales en el genoma y se pueden heredar en múltiples combinaciones diferentes que determinan dos haplotipos en el ser humano. El haplotipo A es aquel en el que las células NK contienen sobre todo KIRs inhibidores mientras que el haplotipo B posee mayor número de KIRs activadores (Yawata et al., 2006). Cada uno de ellos reconoce moléculas HLA de clase I concretas en la superficie de las células diana. El mecanismo mediante el cual se produce el reconocimiento se conoce como *missing-self* (Ljunggren and Karre, 1990). Cuando una célula tumoral presenta nula o baja expresión de HLA-I, los receptores KIR de la célula NK no unen ninguna molécula HLA por lo que no se desencadena la señal inhibidora frente a lo propio y, por lo tanto, se produce una activación. Es la ausencia de ligando para el receptor KIR lo que se desencadena la activación (Cheng et al., 2013). Por desgracia, las células tumorales desarrollan mecanismos de inmunoevasión que implican la expresión de moléculas HLA-I.

Dentro de la familia de receptores tipo lectina C o familia NKG2, se encuentra el receptor inhibidor NKG2A. Éste forma heterodímeros con CD94 y reconoce como ligando a HLA-E. Posee motivos ITIM propios en su dominio citoplásmico. Al unirse a HLA-E se inhibe la lisis de la célula tumoral (Braud and McMichael, 1999).



#### 2.4.2. Receptores activadores

La ausencia de moléculas HLA en membrana no es suficiente para desencadenar una respuesta en las células NK. Se necesita un mayor número de señales activadoras ya que la señal inhibidora suele tener un papel predominante para evitar una respuesta citotóxica desmedida. Entre los receptores activadores principales se encuentran los de la familia de receptores tipo lectina C, la misma familia que NKG2A. NKG2C y NKG2E también forman heterodímeros con CD94 y reconocen también HLA-E. En su dominio intracelular interactúan con la molécula adaptadora DAP12 que posee motivos activadores basados en tirosina (ITAM; *immunoreceptor tyrosine-based activatory motif*), lo que confiere a estos receptores una función activadora (Braud et al., 1998).

NKG2D (CD314) es la única proteína homodimérica de esta familia y la que posee un papel más importante en la activación. Una vez estimulado se asocia con DAP10 o DAP12 (en función de la isoforma de NKG2D), que también forman homodímeros y se autofosforilan en sus ITAM para transducir la señal, ya que NKG2D carece de motivos de señalización intracelular propios. A diferencia del resto de miembros NKG2, detecta varios ligandos que se inducen en células sometidas a estrés o con daño en el ADN (Gasser and Raulet, 2006). Sus ligandos son las proteínas de cadena relacionada con el complejo principal de histocompatibilidad (MIC; *MHC class I chain-related protein*) A y B, y las proteínas de unión a UL16 (ULBP; *UL16 binding protein*) 1 a 6 (Raulet, 2003).

Otra familia de receptores activadores dominante es la de los NCR, prácticamente exclusiva de células NK. Está compuesta principalmente por NKp30 (CD337) cuyo papel es mayoritario, NKp44 (CD336) y NKp46 (CD335). NKp30 no posee homología con NKp44 o NKp46 pero se agrupan debido a su función y su perfil de expresión (Kaifu et al., 2011). Sus ligandos no están del todo claros, entre ellos se han descrito moléculas víricas como la hemaglutinina o pp65, y BAT3 para NKp30, pero, recientemente, se ha descrito el ligando B7-H6 para NKp30 exclusivo de células tumorales (Brandt et al., 2009). Y más recientemente aún, se ha descubierto un ligando para NKp44 únicamente expresado en células tumorales o transformadas, una nueva isoforma de la proteína MLL5 que al contrario que el resto de miembros de la familia MLL, se expresa en membrana

(Baychelier et al., 2013). Mientras que NKp30 y NKp46 se asocian a las moléculas adaptadoras CD3 $\zeta$  y FcR $\gamma$  que llevan motivos ITAM, NKp44 lo hace con DAP12.

Los receptores de la familia SLAM también se encuentran muy caracterizados en la activación de las células NK. Éstas expresan prácticamente todos los miembros de esta familia salvo SLAMF1. Interactúan con otras células mediante unión homofílica salvo para 2B4 (CD244) que se une a CD48. Poseen motivos activadores basados en tirosina denominados ITSM que transmiten la señal activadora a través de la proteína asociada a SLAM (SAP) (Veillette, 2006).

Existen además muchas moléculas coestimuladoras, pero la información sobre las propiedades de su señalización es limitada. Entre ellas, una de las más relevantes es la molécula accesoria 1 DNAX (DNAM-1; *DNAX accessory molecule-1*). DNAM-1 (CD226) es una molécula de adhesión que se asocia con LFA-1 en membrana y se une a ligandos como el receptor de poliovirus (CD155) o la nectina 2 (CD112) cuya expresión se ha descrito en situaciones patológicas y de estrés celular (Sakisaka and Takai, 2004, Chan et al., 2014). Otras como NKp65 o NKp80 también contribuyen a la señalización activadora. Se unen a proteínas tipo lectina C determinadas y poseen motivos ITAM propios en su dominio intracelular.

Como ya se ha mencionado, existen receptores KIR activadores, éstos poseen un dominio intracelular corto asociado a motivos ITAM. Los principales KIR activadores son KIR2DS1 y KIR3DS1 que se unen a HLA-B y C respectivamente.

Posee un papel también importante la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) que en células NK se desencadena a través del receptor CD16 (Fc $\gamma$ RIIIa). Mediante unión a la fracción constante Fc de los anticuerpos, CD16 produce una señal activadora muy potente en la célula NK, que sobrepasa la señal inhibidora predominante sin necesidad de otras señales, para destruir la célula diana recubierta de anticuerpos. La especificidad de esta respuesta viene determinada por las células B productoras de anticuerpos lo que justifica la no necesidad de una señalización sinérgica con otros receptores (Long et al., 2013).

Aunque actúan mediante un mecanismo distinto, los ligandos de apoptosis también merecen especial mención en este apartado ya que se encuentran implicados en la actividad citotóxica de las células NK y en la inmunovigilancia en los procesos tumorales. Son la familia de ligandos del factor de necrosis tumoral, suelen ser proteínas de membrana, aunque pueden tener variantes solubles. Sus ligandos se expresan en múltiples tipos celulares, sin estar restringido a procesos tumorales o células estresadas. El ligando de CD95/Fas (FasL) se expresa en células NK, forma trímeros en membrana que interactúan con trímeros de Fas en la célula diana. Posteriormente, recluta a la proteína FADD y a la procaspasa-8. La caspasa-8 madura se libera del complejo formado dejando lugar a una nueva procaspasa-8 produciéndose así el ciclo de activación de la procaspasa. El ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF (TRAIL; *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) tendría un mecanismo de acción similar a través de los receptores TRAIL-R1 y TRAIL-R2 que activarían la caspasa-8 (Wajant, 2006). Aunque el mecanismo directo que produce la formación de los trímeros no está claro, se ha descrito que este mecanismo podría ser desencadenado por anticuerpos (Wajant, 2015).

## 2.5. Mecanismo de citotoxicidad

El primer paso que activa las células NK es la unión receptor-ligando que produce el agrupamiento de los receptores, éstos sufren un cambio conformacional debido a la reorganización de la actina y, posteriormente, da lugar a la transducción de señales que se inicia en la fosforilación de los motivos ITAM o ITIM. Ésta es dependiente de las quinasas de la familia Src que se concentran en las zonas de agrupamiento de los receptores (Watzl and Long, 2010). Rápidamente tras la interacción receptor-ligando, la cascada de señales en las células NK produce la activación de las proteínas Vav, esenciales para la polarización de los gránulos hacia la célula tumoral, así como con la fosforilación de la proteína PLC- $\gamma$ 2 y la subsecuente movilización de calcio desde retículo endoplásmico, para producir finalmente la degranulación hacia el espacio intercelular. La perforina literalmente perfora la membrana celular de la célula diana permitiendo la entrada de serin proteasas conocidas como granzimas. Las granzimas A y B son las más

abundantes y generan apoptosis a través de mecanismos tanto dependientes como independientes de caspasas (Trapani et al., 2000).

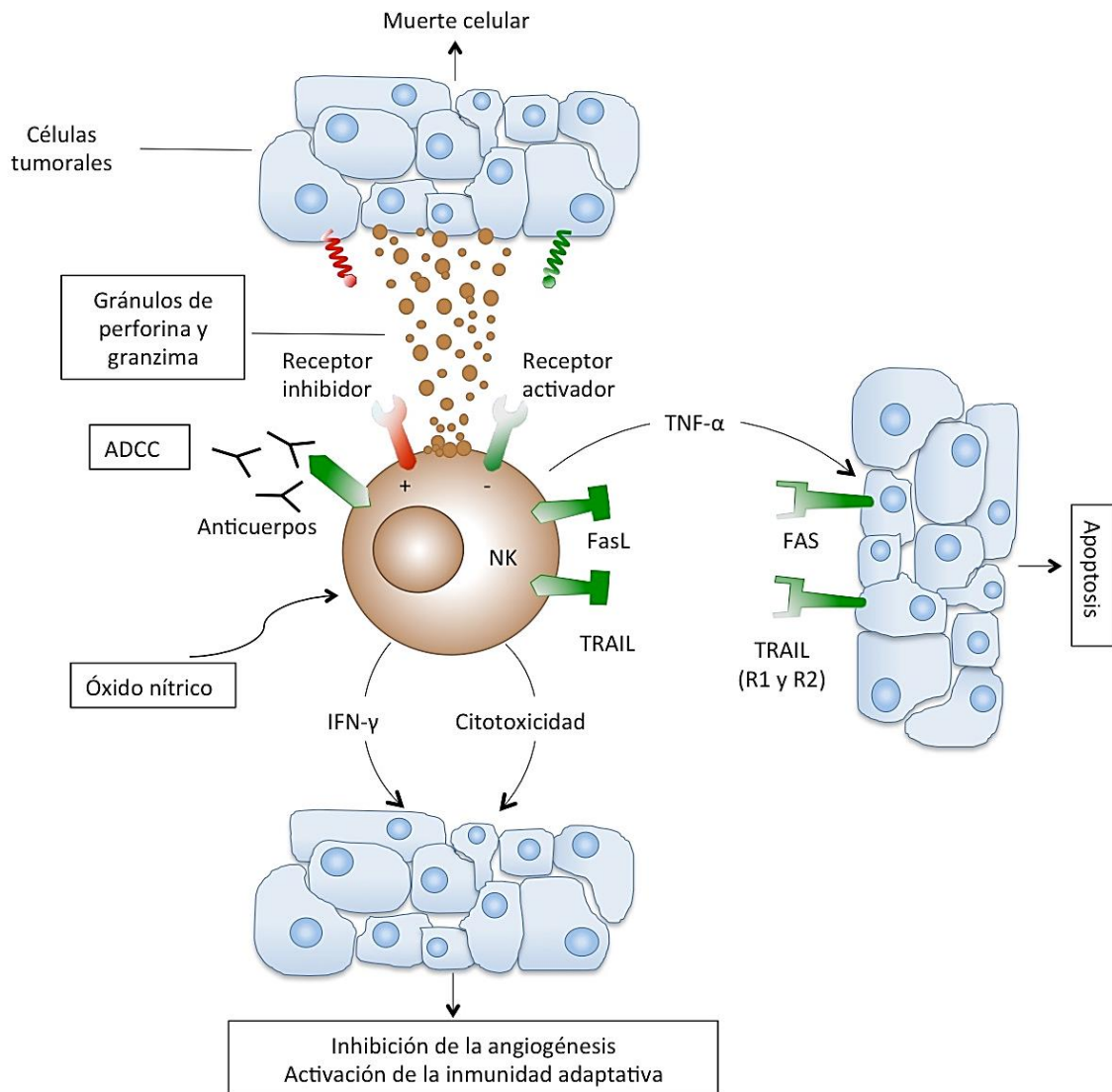


Figura 3. **Mecanismos de citotoxicidad de las células NK.** Representación esquemática de las diferentes vías de activación de las células NK y los procesos que desencadenan para realizar la destrucción de células infecciosas, tumorales o estresadas.

Pero las células NK pueden destruir la célula tumoral mediante otros mecanismos (figura 3), como la inducción directa de apoptosis mediante interacción de los ligandos TRAIL y FasL, que se expresan en algunas células NK, con sus respectivos receptores en la célula tumoral FAS, TRAIL-R1 y TRAIL-R2. Las células NK activadas pueden también secretar  $\text{TNF-}\alpha$  para producir apoptosis (Sutlu and Alici, 2009). Otro mecanismo implicaría la secreción por parte de las células NK de moléculas como  $\text{IFN-}\gamma$  que posee funciones antitumorales mediante restricción de la angiogénesis y de manera indirecta mediante estimulación de la inmunidad adaptativa, como inducción de linfocitos T citotóxicos. Finalmente, se ha descrito que las células NK podrían responder a la modulación mediada por óxido nítrico, aunque el mecanismo por el cual se produce es desconocido (Smyth et al., 2002).

### 3. TERAPIA CELULAR

En los últimos años la terapia celular ha evolucionado de manera exponencial. No obstante, para que una terapia de este tipo tenga éxito, no sólo debe tener un efecto clínico sino que también debe ser optimizada en todos los aspectos posibles, tanto en el planteamiento del diseño experimental de la terapia así como en las condiciones de manufacturación y distribución, y los aspectos de regulación legal (Lee, 2016). Actualmente, la terapia celular posee un coste elevado, al igual que otros fármacos que se encuentran en investigación clínica, dada la necesidad de manipular y procesar las células en condiciones de buenas prácticas de manufacturación (GMP; *good manufacturing procedures*) por personal altamente cualificado, así como por la duración del proceso. Aun así, las constantes optimizaciones que se producen en el proceso junto con la aplicabilidad clínica demostrada permitirán reducir los costes de una terapia con mucho potencial (Campbell et al., 2015).

A día de hoy, lo más similar a la terapia celular utilizado en la rutina hospitalaria en enfermedades hematológicas es el trasplante de progenitores hematopoyéticos. Desde un punto de vista simplista, la terapia celular consistiría en utilizar células autólogas o alogénicas para el tratamiento de una enfermedad determinada. En ese sentido, el trasplante hematopoyético sería el primer representante de esta categoría terapéutica. Teniendo en cuenta que su realización ha mejorado significativamente la supervivencia en pacientes con MM (Kumar et al., 2008), en los casos de trasplante alogénico a través de un efecto de injerto contra tumor (Bjorkstrand et al., 2011), tiene sentido seguir avanzando con este tipo de abordajes terapéuticos basados en terapia inmunológica.

En fase de investigación se encuentran múltiples terapias que utilizan la célula como agente terapéutico. Dentro de éstas existen dos tipos diferenciados, las que utilizan células madre como agente regenerador de tejido para sustituir células dañadas, y, por otro lado, las que realizan estrategias de activación del sistema inmune para utilizar esas células activadas como agente citotóxico antitumoral. A continuación, se realiza una descripción detallada del segundo tipo aplicado sobre todo a MM.

### 3.1. Vacunas de células dendríticas

Estudios realizados en MM han demostrado que linfocitos T procedentes de pacientes son capaces de generar una respuesta cuando son expuestos a péptidos que se corresponden con regiones complementarias de las cadenas pesadas y ligeras de las Igs de la proteína monoclonal autóloga (Hansson et al., 2003). Bajo esta premisa, muchos ensayos clínicos han utilizado proteínas idiotípicas (antígenos específicos de tumor que pueden ser utilizados para inmunizar al sistema inmune frente a ellos) como SLAMF7 y CD138 entre otros, para intentar reclutar y activar las células dendríticas. Dado que los pacientes con MM muestran deficiencias funcionales en sus células dendríticas, este abordaje no es muy efectivo (Hayashi et al., 2003). Otra estrategia empleada para intentar evitar este problema es la expansión *ex vivo* de células dendríticas autólogas para, posteriormente, infundirlas a los pacientes. Se generan células dendríticas con una capacidad de presentación de antígeno potente que después pueden ser “cargadas” con las proteínas idiotípicas de interés. Una vez infundidas, presentarían estos antígenos específicos de tumor para producir una inmunización en el paciente. En estos estudios se han apreciado respuestas inmunológicas, como la inducción de linfocitos T pero, curiosamente, la inducción es mayor en linfocitos T CD4<sup>+</sup> que en los CD8<sup>+</sup> (Dembic et al., 2000). Este tipo de abordaje terapéutico ha resultado ser poco efectivo en la clínica (Reichardt et al., 1999, Yi et al., 2010, Rollig et al., 2011).

Uno de los mecanismos de inmunoescape de las células de MM es la regulación de la expresión de los antígenos de superficie para evitar ser detectadas. Por este motivo estas estrategias resultan ineficaces. Otro método para intentar obtener células dendríticas aún más potentes que generen mayor inmunogenicidad frente a MM es la realización del cultivo *ex vivo* exponiéndolas a células tumorales completas o a lisados celulares (Lee et al., 2007). De este modo, las células dendríticas no presentarán un único antígeno si no que se cargarán con todo el repertorio de antígenos de la célula de MM desencadenando una respuesta antitumoral global. Los mejores resultados se han observado al cargar las células dendríticas con ácidos ribonucleicos (ARN) o ácidos desoxirribonucleicos (ADN) de células de MM (Milazzo et al., 2003, Fioretti et al., 2010, Signori et al., 2010) y sobre todo con cuerpos apoptóticos, observándose una mayor

inducción de linfocitos T citotóxicos frente a células de MM autólogas (Hayashi et al., 2003, Yang et al., 2010).

Una estrategia eficaz en este campo es la fusión de células dendríticas autólogas con células tumorales (Vasir et al., 2005). Este proceso consiste en la obtención de células mononucleares de SP (CMSPs) mediante leucoaféresis y cultivo con interleuquina-4 (IL-4), factor de estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos y, plasma autólogo de pacientes con MM. Por otro lado, se realiza un aspirado de médula ósea (AMO) para la obtención de las células de MM autólogas y, finalmente, se realiza la fusión con las células dendríticas mediante cocultivo con polietilenglicol y varios pasos de lavado (Avigan et al., 2004). En pacientes tratados con LEN se ha observado una gran estimulación de los linfocitos T específicos de tumor, tanto citotóxicos como colaboradores. Los resultados de ensayos clínicos han demostrado que esta estrategia no posee ningún tipo de toxicidad asociada (Rosenblatt et al., 2011).

La preparación de vacunas de células dendríticas es muy laboriosa dado que requiere la expansión *ex vivo* durante semanas, la obtención de varias muestras del paciente, la aplicación de técnicas para realizar la fusión o en su defecto la purificación del antígeno tumoral.

### 3.2. Terapia basada en receptores quiméricos antigénicos

Inicialmente, los receptores quiméricos antigénicos (CAR) fueron diseñados para ser expresados en células T como una fusión de un anticuerpo y subunidades del receptor de células T (TCR) que mediaban respuestas independientes del sistema HLA (Eshhar et al., 1993, Maher et al., 2002, Friedmann-Morvinski et al., 2005). Estos constructos no generaban fuertes respuestas citotóxicas por lo que durante las últimas décadas se ha ido mejorando su diseño. Lo que se denominó como la “primera generación” de CARs estaba formada por una cadena de fragmento variable (scFv) derivada de un anticuerpo monoclonal junto con 1 dominio de señalización del receptor TCR, como CD3 $\zeta$ . Posteriormente, la incorporación de 1 dominio activador procedente de moléculas coestimuladoras como CD28, 4-1BB (CD137) y/o CD134 (OX-40) dio lugar a la segunda generación de CARs, y la tercera generación incorpora 2 de estos dominios.



Esto supuso un gran avance en esta tecnología, la adición de moléculas coestimuladoras confería a estos receptores gran capacidad para desencadenar proliferación, mayor citotoxicidad y resistencia a la apoptosis (Maher et al., 2002, Imai et al., 2005).

Existen diferentes métodos para introducir estos receptores en la célula de interés. Los que se encuentran más establecidos conllevan la utilización de retrovirus o lentivirus como vehículo. Estos métodos integran la secuencia del receptor de manera muy eficaz y estable en el genoma de la célula. Pese a la inquietud que suscita la existencia de una posible mutagénesis insercional o la posibilidad de respuestas inmunes contra antígenos retrovirales, a día de hoy, estos métodos han demostrado ser seguros y eficaces (Grupp et al., 2013). Una vía de estudio es la incorporación de “genes suicida”, de este modo se pueden eliminar las células que contienen el CAR si se observasen efectos adversos asociados a éste (Di Stasi et al., 2011). Como alternativa para eludir estos inconvenientes se están explorando métodos no virales como la electroporación de mRNA para realizar la transfección directa de la secuencia de interés (Boissel et al., 2012), el uso de transposones (Singh et al., 2008), o la transferencia de material genético mediante trogocitosis (Somanchi et al., 2012, Cho et al., 2014). Estos métodos constituyen una alternativa menos costosa y relativamente fácil de desarrollar, pero la duración de su efecto es excesivamente corta, limitada en algunos casos a sólo 72 horas (Li et al., 2010).

Siempre se ha utilizado células T como modelo para la fabricación de CARs debido a la gran cantidad de estas células que se puede encontrar en sangre periférica y su larga vida media. Generalmente, estos CARs suelen llevar la región scFv, en muchos casos de CD19, que le confiere la especificidad frente a un antígeno concreto, y CD3 $\zeta$  fusionado con CD28 (Kochenderfer et al., 2013, Lee et al., 2015). No obstante, la especificidad frente a un antígeno no confiere especificidad frente a tumor y es ahí donde la acción de un T-CAR puede sobrepasar los límites deseados, mediando lo que se denomina un efecto “on-target/off-tumor”, es decir reaccionar frente al antígeno de interés, pero en células no tumorales. Estos efectos pueden resultar fatales como quedó demostrado en el ensayo clínico descrito por Morgan y sus colaboradores en el que se utilizó un T-CAR específico para atacar HER2 en carcinoma metastásico de colon. Esta terapia produjo una liberación masiva de citoquinas, como ha ocurrido en otros casos, atacando el

epitelio pulmonar ya que éste presentaba una ligera expresión de HER2, las complicaciones pulmonares tuvieron como desenlace el fallecimiento del paciente (Morgan et al., 2010, van den Berg et al., 2015). En MM la experiencia clínica es limitada y se encuentra todavía en fases tempranas, como el CAR CM-CS1-T (NCT02203825), células modificadas para expresar un CAR frente a ligandos de NKG2D, el CART-138 (NCT01886976), el CART-BCMA (B-Cell Maturation Antigen) (NCT02215967) o el CAR-K+ en células T, CAR frente a la cadena kappa de inmunoglobulina expresada en pacientes (NCT00881920). En ratones tratados con CAR-NKG2D se ha descrito la producción del síndrome de liberación de citoquinas por lo que los mecanismos de destrucción de este tipo de células necesitan ser explorados en detalle antes de ser instaurados definitivamente en el ámbito clínico (Sentman et al., 2016).

Las células NK representan una buena alternativa a las células T, poseen capacidad para generar una respuesta inmune en el huésped, pero su vida media es mucho más limitada lo que impedirá efectos adversos debidos a la acción mantenida de estas células. Gozan de actividad citotóxica espontánea y pueden lisar sus células diana vía mecanismos específicos de detección de antígenos asociados a tumor. Además, también expresan receptores que desencadenan citotoxicidad dependiente de anticuerpo FcγRIII/CD16 pudiendo atacar células tumorales a través de diferentes mecanismos. Otra característica que hace que las NKs sean mejores candidatos que las células T es su capacidad de destruir células en serie tanto en líneas celulares como en células primarias. Líneas celulares como la NK-92 se han utilizado para generar NK-CARs con un eficiencia bastante alta incluso con métodos no virales (Klingemann, 2014). En el caso de los NK-CAR la experiencia a nivel clínico es más limitada.

Los primeros diseños de CAR en NKs se centraban en la expresión de anti-CD19 y anti-CD20 para el tratamiento de hemopatías de células B (Imai et al., 2005). Actualmente, se siguen utilizando la mayoría con líneas celulares de NK (como NK-92) pero también con NK de SP (Boissel et al., 2009, Boissel et al., 2013). Otras estrategias en NK-92 emplean CARs anti-GD2, gangliósido expresado en tumores como el neuroblastoma y el cáncer de mama, o la molécula epitelial de adhesión celular (EpCam) marcador pan cancerígeno (Sahm et al., 2012, Schonfeld et al., 2015). Existen modelos de NK-CARs no enfocados a cáncer, como el CAR anti-CD4 cuyo fin es eliminar las células

infectadas por el virus del VIH o el anti-EBNA3C para la destrucción de células infectadas por EBV (Tassev et al., 2012, Ni et al., 2014).

Otras estrategias enfocadas a mejorar la expresión de receptores propios de la célula NK se basan en la combinación de zonas extracelulares de NCR con dominios intracelulares coestimulatorios. Los NKG2D-CAR son de los más utilizados, inclusive en células T (Song et al., 2013). Entre los CAR de tercera generación se encuentran los formados por la combinación de NKG2D con DAP10 y CD3 $\zeta$ . De este modo, estos CARs favorecen la transducción de la señal y tienen una gran actividad citotóxica frente a tumor ya que NKG2D posee afinidad por varios ligandos tumorales específicos como los ULBP, MICA y B. Al ser específicos de célula tumoral pero no de tipo celular resultan una terapia idónea para múltiples tipos de cáncer. Esta construcción también se puede insertar por electroporación con elevada eficiencia (Chang et al., 2013). En MM, sólo existen resultados de experimentos *in vitro* e *in vivo* con líneas celulares de NK con CAR-138 (Jiang et al., 2014) o CS1-CAR (Chu et al., 2014).

### 3.3. Reprogramación de células madre

Consiste en el cultivo de células pluripotentes procedentes de blastocistos cuyo uso para fecundación *in vitro* haya sido descartado (Thomson et al., 1998) y también se explora la posibilidad de obtenerlas de placenta (Antoniadou and David, 2016). Su utilización está estrictamente regulada, aun así, el desarrollo como terapia regenerativa se encuentra muy avanzado en patologías oftalmológicas, y en lesiones de la médula espinal (Nazari et al., 2015, Damdimopoulou et al., 2016).

El uso de células pluripotentes inducidas podría evitar los problemas éticos y legales que suponen las células embrionarias. Utilizando los factores de transcripción Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc, se pueden reprogramar células somáticas, como los fibroblastos, desdiferenciándolas hasta un estado de célula madre pluripotente (Takahashi et al., 2006). Además, se pueden usar como origen células propias del paciente mejorando así el perfil de seguridad. Al igual que para las células madre embrionarias, para estas terapias aún se necesita confirmar la ausencia de potencial teratogénico. Algunos estudios han modificado los factores implicados en la

reprogramación para otorgar a las células mayor seguridad, pero con resultados menos eficientes (Buganim et al., 2014). En el ámbito de producción de células NK como terapia antitumoral este abordaje se encuentra aún en una fase totalmente experimental (Eguizabal et al., 2014) pero, estudios recientes demuestran que es posible obtener células NK a escala clínica a partir de células madre embrionarias o de células pluripotentes inducidas (Bock et al., 2013, Knorr et al., 2013) y que posee citotoxicidad *in vitro* frente a células cancerígenas (Hermanson et al., 2016).

Otra estrategia descrita es la que implica la utilización de progenitores CD34<sup>+</sup> procedentes de cordón umbilical junto con células estromales y una combinación de citoquinas para diferenciar estos progenitores a células NK. En estudios preclínicos, estas NKs han demostrado eficacia frente a células leucémicas (Luevano et al., 2014).

#### 3.4. Terapia con linfocitos activados *ex vivo*

Paralelamente al desarrollo de la terapia con CARs, se encuentra también en desarrollo avanzado la activación en cultivo de CMSPs. Lo que se pretende con este tipo de abordaje es estimular *ex vivo* la capacidad de estas células para reconocer células tumorales, su actividad citotóxica y su proliferación. Una de las ventajas de esta estrategia frente al desarrollo de CARs es que se evita la manipulación genética de las células y con ello el riesgo de desarrollo de toxicidades desconocidas. Las células NK y las NKT son las más susceptibles de ser utilizadas ya que, como ya se ha mencionado, poseen actividad citotóxica espontánea y capacidad para destruir células tumorales mediante diferentes vías específicas.

Inicialmente, este proceso se realizaba con células asesinas activadas por linfoquinas o células LAK (*lymphokine activated killer cells*) que se obtienen por purificación de CMSPs y posterior estimulación en cultivo mediante exposición a altas concentraciones de IL-2. La mayoría de las células que se obtienen son células NK, aunque suele detectarse también la presencia de linfocitos T CD3. Estas células adquieren potente capacidad citotóxica *in vitro* frente a células tumorales. A nivel clínico se ha demostrado que podrían resultar eficaces como adyuvantes en terapia de mantenimiento en enfermedades hematológicas (Garcia-Munoz et al., 2016). Diversos

grupos han establecido diferentes protocolos de expansión para obtener células LAK más eficaces *in vivo* mediante adición de anticuerpo anti-CD3 al cultivo. Este tipo de terapia ha mostrado seguridad en ensayo clínico. Los únicos riesgos son los asociados a la infusión de células alogénicas (Barkholt et al., 2009). Las células NKT, también conocidas como células asesinas inducidas por citoquinas o CIK, de sus siglas en inglés *cytokine induced killer*, son linfocitos T que expresan el marcador de células NK CD56, pero también el de linfocitos T CD3. A diferencia de las LAKs, las CIKs se obtienen mediante incubación secuencial y controlada con IFN- $\gamma$ , IL-2 y anti-CD3 (Schmidt-Wolf et al., 1991). Esto les confiere mayor capacidad citotóxica que las LAK.

Algunos grupos han establecido protocolos de purificación de células NK mediante depleción inmunomagnética de linfocitos CD3 (Leung et al., 2005) pero se necesitan métodos que permitan obtener mayor cantidad de células y más citotóxicas, ya que su efecto *in vivo* sigue siendo limitado tanto porque las NK obtenidas no poseen una citotoxicidad *in vivo* destacada, como por el aumento de linfocitos T reguladores (Treg) en SP, que regulan y limitan la acción de las NK (Geller et al., 2011). Una de las formas de obtención de grandes cantidades de células NK es la utilización de líneas celulares de NKs como la NK-92, utilizada en ensayos clínicos, pero requiere irradiación previa para evitar su excesiva proliferación *in vivo* (Gong et al., 1994, Tam et al., 2003).

En pleno desarrollo se encuentran métodos para activar y expandir NKs primarias tanto autólogas como alogénicas (Koepsell et al., 2013). Se basan en la utilización de células cebadoras, que actúan como células presentadoras de antígeno, proporcionando señales estimuladoras de la activación y la proliferación de las células NK del cultivo. Generalmente, se realizan cocultivos de CMSPs con las células cebadoras, en presencia de IL-2, entre 7 y 21 días, en algunos casos hasta 28 días. Estas células cebadoras deben ser irradiadas con altas dosis de rayos X (RRXX) para evitar su proliferación y así permitir únicamente la de las células NK. Al finalizar ese periodo, se obtiene un cultivo prácticamente puro en células NK. Como células cebadoras se han utilizado monocitos (Miller et al., 1992), CMSPs (Siegler et al., 2010, Ahn et al., 2013) y más recientemente, líneas celulares modificadas genéticamente. Líneas de este tipo son la línea linfoblastoide B transformada con el virus Epstein-Barr EBV-LCL (Perussia et al., 1987, Granzin et al., 2015), la línea procedente de crisis de leucemia mieloide crónica K562

transducida con IL-15 y con 41-BBL (ligando de CD137) K562-mb15-41BBL sintetizada por el grupo de Dario Campana (Fujisaki et al., 2009, Cho and Campana, 2009), o esta misma línea transducida además con IL-21 por el grupo de Dean Lee (Wang et al., 2013b, Denman et al., 2012). Todas ellas han mostrado niveles de expansión muy elevados, a escala logarítmica, y una citotoxicidad superior a la de la mayoría de métodos *in vitro* (Shimasaki et al., 2016). *In vivo*, se encuentran en desarrollo clínico con resultados alentadores en oncología pediátrica y en onco-hematología (Chabannon et al., 2016, Childs and Berg, 2013). En MM, el grupo de la universidad de Arkansas puso en marcha varios ensayos clínicos fase II con células NK autólogas expandidas con la línea K562-mb15-41BBL para el tratamiento de MM asintomático (NCT01884688) sin resultados a día de hoy, y también para MM de alto riesgo en recaída en combinación con bortezomib (NCT01313897) mostrando una baja toxicidad (Szmania et al., 2015).

Todas estas terapias son experimentales y se encuentran en desarrollo, por lo que ninguna de ellas está estandarizada. Establecer la dosis, la frecuencia de administración, así como los efectos adversos en cada tipo de patología resulta esencial para evaluar con rigurosidad su seguridad, su eficacia y poder instaurarlas en un futuro en la práctica clínica.



// Justificación del estudio





El mieloma múltiple es una enfermedad dolorosa, invalidante, y a día de hoy, incurable. Gracias al desarrollo de fármacos antimieloma de nueva generación, como los inmunomoduladores o los inhibidores del proteasoma, se ha mejorado considerablemente la supervivencia de los pacientes con mieloma múltiple. El tratamiento consigue que la enfermedad se reduzca hasta niveles prácticamente indetectables en muchos casos, pero a pesar de ello, la enfermedad no desaparece, los pacientes dejan de responder al tratamiento y sufren recaídas hasta volverse refractarios. Una de las principales causas de esta incurabilidad, es que la mayoría de tratamientos actuales no son capaces de destruir la célula madre tumoral, aquella responsable de la persistencia y la progresión de la enfermedad. Por este motivo, existe una necesidad imperiosa de encontrar nuevas modalidades de tratamiento que sean capaces de destruir por completo las células de MM, y concretamente, las células madre que muestran resistencia a fármacos y una mayor capacidad proliferativa.

El evento inicial que da origen al MM se desconoce, pero sí se ha descrito una desregulación del sistema inmune. Este sistema constituye nuestra barrera de defensa y su fallo permite la evolución y el asentamiento de células aberrantes. Además, uno de los mecanismos de acción de los tratamientos antimieloma actuales es que estimulan el sistema inmune. Estos hechos constituyen la base del desarrollo de los fármacos antimieloma más novedosos, la terapia biológica con anticuerpos específicos frente a MM que está mostrando buenos resultados en investigación clínica. Los anticuerpos sólo activan una pequeña parte del repertorio de mecanismos de defensa del sistema inmune, la realización de terapia celular empleando células inmunes completas podría estimular diferentes mecanismos y desencadenar así una mayor respuesta frente a tumor. Actualmente, se encuentran en investigación como terapia alogénica, entre ellos, la terapia con células NK procedentes de donantes sanos. El inconveniente de la terapia alogénica conlleva numerosos efectos adversos. Por ese motivo, y dada la necesidad de encontrar nuevas terapias frente a MM, en este estudio se evalúa el potencial desarrollo de la terapia con células NK autólogas en pacientes con MM.



// Hipótesis y objetivos



## HIPÓTESIS

La hipótesis de partida de este estudio es que las células NK procedentes de pacientes con MM pueden ser activadas y expandidas *ex vivo* y que éstas son eficaces frente a MM, inclusive frente a la célula tumoral clonogénica o la célula resistente a fármacos. Por otro lado, la infusión de células NK activadas y expandidas autólogas combinada con terapia antineoplásica de nueva generación resulta segura y eficaz en pacientes con MM refractario o en recaída. Por lo tanto, la terapia celular con NK activadas y expandidas constituiría una buena opción terapéutica como tratamiento coadyuvante para MM.

## OBJETIVOS

El objetivo global de este estudio fue demostrar que es plausible obtener células NK para realizar su activación y proliferación *ex vivo* a escala clínica, para su uso como terapia celular autóloga, a partir de sangre periférica de pacientes con mieloma múltiple. Asimismo, se quiso demostrar la seguridad y eficacia de la infusión de estas células en pacientes con mieloma múltiple.

Para cumplir con este objetivo se plantearon los siguientes objetivos concretos:

- Demostrar la existencia de una disfunción en las células NK procedentes de pacientes con MM.
- Evaluar el potencial proliferativo de las células NK mediante realización de cocultivo con la línea celular K562-mb15-41BBL.
- Evaluar la capacidad de las células NKAЕ obtenidas para destruir células de MM.
- Determinar qué receptores se encuentran implicados en la actividad citotóxica de las células NKAЕ obtenidas.
- Evaluar la capacidad de las células NKAЕ para destruir la célula tumoral clonogénica de MM y la célula resistente a fármacos de MM.
- Determinar la toxicidad de las células NKAЕ en pacientes con mieloma múltiple en el contexto de un ensayo clínico.
- Evaluar la respuesta a la infusión de células NKAЕ en pacientes con mieloma múltiple mediante seguimiento de la enfermedad en el contexto de un ensayo clínico.



// Materiales y Métodos





## 1. PACIENTES Y MUESTRAS

Para la realización de este trabajo se ha utilizado muestras de pacientes diagnosticados de MM en el Hospital Universitario 12 Octubre según criterios diagnóstico de MM sintomático establecidos por el IMWG. Las muestras utilizadas procedían de sangre periférica y médula ósea de pacientes con MM. Los pacientes elegidos para el estudio fueron pacientes de nuevo diagnóstico o en recaída, así como pacientes en tratamiento con lenalidomida, pomalidomida y/o bortezomib.

Se utilizaron muestras procedentes de donantes sanos (de ahora en adelante donantes) sin ninguna patología hematológica como comparativa. Las muestras de SP se obtuvieron de donantes de sangre del H12O. Las muestras de MO sana fueron obtenidas de pacientes sometidos a cirugía vertebral o de cadera procedentes del servicio de traumatología del H12O que no presentaban patología sistémica. El número de muestras utilizado para cada experimento se describirá en los apartados correspondientes.

## 2. CULTIVOS DE LÍNEAS CELULARES

Para el estudio de la patología *in vitro* se utilizaron líneas celulares de MM. Las líneas celulares U-266, RPMI-8226, NCI-H929, OPM-2, L-363, JJN-3 y SK-MM-2 procedían de DSMZ (Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania). Para el cultivo inicial de cada una de las líneas se descongeló el vial y se transfirieron las células a un tubo Falcon® de 15 ml que contenía 5 ml de medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) estéril suplementado con 2 mM de glutamina estable y un 10% de suero bovino fetal (FBS) con el fin de diluir el conservante utilizado para la congelación. Se centrifugó el tubo durante 5 minutos (mins) a 1200 revoluciones por minuto (rpm). Una vez finalizada la centrifugación se retiró el sobrenadante mediante aspiración por vacío con pipeta Pasteur de cristal estéril (Normax, Lda, Marinha Grande, Portugal) y el pellet celular se resuspendió en 1 ml de medio RPMI 1640 completo (con 2 mM de glutamina estable y 10% de FBS). Posteriormente, se realizó el recuento del número de células presente con azul de tripán 0,4% (Gibco™, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA,

Estados Unidos) para descartar las células no viables, mediante el uso de cámara de Neubauer (VWR INTERNATIONAL EUROLAB, Barcelona, España). Se realizó una mezcla de muestra celular y azul tripán a una ratio 1:1 y se introdujo una alícuota en la cámara de Neubauer. Se realizó el recuento de las 4 cuadrículas principales, cada una de ellas admite un volumen de 0,1 µl, se calculó la concentración por ml mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} = \text{Número de células} / 4 \times \text{factor de dilución (2)} \times 10.000$$

Una vez obtenido el número inicial de células, cada línea celular se sembró en un frasco de cultivo, con membrana hidrofóbica para intercambio de gases, de 25 o 75 cm<sup>2</sup> de superficie (en función de la densidad necesaria especificada por la casa comercial y el número de células total). Se mantuvieron en cultivo en ambiente húmedo a una temperatura de 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub>. Durante los primeros días de cultivo se cuantificó la concentración cada 24 horas hasta apreciar un crecimiento de cultivo. Tras el establecimiento del cultivo, se cuantificó la concentración cada 48 o 72 horas en función de la velocidad de crecimiento hasta alcanzar el límite de confluencia determinado por la casa comercial momento en el cual se realizaba un nuevo pase. Cada cultivo sembrado se mantuvo un máximo de 60 días o hasta finalizar el experimento para el que estuviese destinado.

Para los experimentos de expansión y activación de células NK se utilizó la línea celular K562-mb15-41BBL, amablemente cedida por el Dr. Dario Campana (St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee, Estados Unidos). Esta línea se sembró siempre con una antelación previa de 14 días a los experimentos de expansión y activación de NK para los que estaba destinada en medio RPMI 1640 completo en las mismas condiciones de cultivo que el resto de líneas celulares.

Las líneas celulares fueron analizadas para corroborar la ausencia de mycoplasma.

### 3. ESTUDIOS EN NKS Y NKS ACTIVADAS Y EXPANDIDAS

#### 3.1. Obtención de células mononucleares

Las muestras de SP fueron obtenidas por el personal de enfermería del H120 mediante punción venosa en tubos para extracción de sangre por sistema de vacío con ácido etilendiaminotetraacético dipotásico (K<sub>2</sub>EDTA) de 9 ml. Las muestras se procesaron en condiciones de asepsia en una cabina de flujo laminar de tipo II Clase A2 (Nuaire, Plymouth, MN, Estados Unidos) para la separación de células mononucleares de sangre periférica. Para ello, se añadió medio de densidad Ficoll-Paque™ Plus en un tubo Falcon® de 15 ml o 50 ml en función de la cantidad de muestra, y siempre en una proporción 1:2 (Ficoll-Paque™ Plus: muestra de SP). Posteriormente, mediante el uso de una pipeta Pasteur de plástico estéril (Biosigma, Venecia, Italia), se deslizó lentamente el volumen correspondiente de SP por la pared del tubo para evitar la mezcla con el medio de densidad.

La separación se realizó mediante centrifugación de los tubos a 1500 rpm durante 30 mins sin freno a temperatura ambiente (TA). Transcurrido ese tiempo, se aisló el anillo de CMSPs situado en la interfase entre la capa inferior de Ficoll-Paque™ Plus y la capa superior de plasma sanguíneo (figura 4).

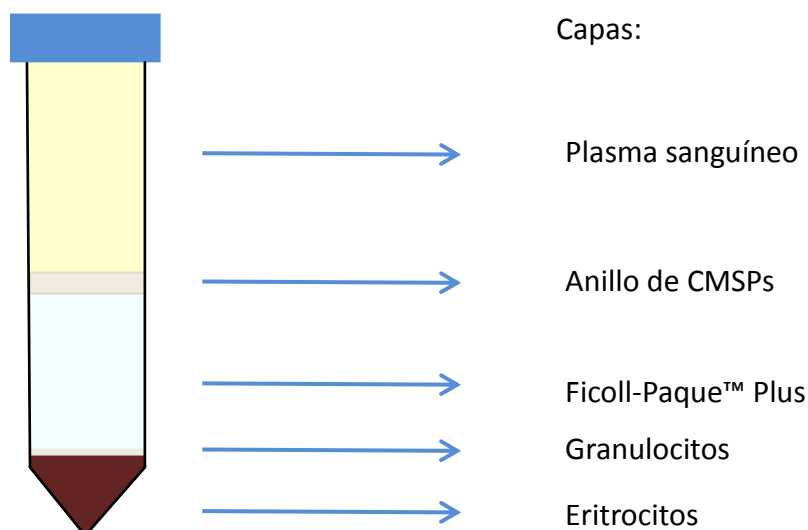


Figura 4. **Representación esquemática de las diferentes capas obtenidas tras el proceso de separación por gradiente de densidad con Ficoll-Paque™ Plus.** Los diferentes componentes de la SP sedimentan en función de su densidad, separando de este modo los diferentes tipos celulares existentes en SP.

Se recogió el anillo con una pipeta Pasteur de plástico y se transfirió a un tubo vacío al que se añadió el volumen necesario de tampón fosfato salino (PBS; Lonza Ibérica, Barcelona, España) hasta llenar el tubo. Se lavó el anillo mediante centrifugación a 1500 rpm durante 10 mins a TA. Una vez finalizado, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en el volumen necesario de medio de cultivo o de PBS en función de los experimentos a los que se destinasen.

### 3.2. Obtención y cultivo de células NKAes

#### 3.2.1. Preparación de células mononucleares de sangre periférica

Para el cultivo de células natural killer activadas y expandidas (NKAe) a partir de SP de pacientes con MM, se realizó el mismo proceso descrito anteriormente, pero con ciertas modificaciones. Se utilizó un volumen mínimo de SP de 18 ml, ésta fue diluida en una proporción 1:1 con PBS suplementado con un 2% de albúmina humana (Albutein 20%, Instituto Grifols, Barcelona, España) y un 2% de EDTA 0,5M pH 8,0 (Ambion, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) siempre en condiciones de asepsia. Se realizó la misma centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Paque™ Plus y se aisló y lavó el anillo de CMSPs con PBS + 2% albúmina humana + 2% EDTA. Se apartó una alícuota de 1 ml para la caracterización y determinación del porcentaje de células NK por citometría de flujo (ver punto 3.3.1.). Se resuspendió el anillo de CMSP en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 2 mM de glutamina estable, suero humano AB al 10% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos), interleuquina-2 (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Alemania) a 100 unidades internacionales (U.I.)/ml, penicilina 5000 U.I./ml al 1%, estreptomicina 5000 µg/ml al 1% y anfotericina B 50 µg/ml al 1% (Pen Strep y Anphotericin B, Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos). Se realizó un recuento del número de células presente y se dejó a una concentración final de  $1 \cdot 10^6$  células /ml en un tubo.

### 3.2.2. Preparación de las K562-mb15-41BBL

Para expandir y activar las células NK es necesario realizar un cocultivo con la línea celular K562-mb15-41BBL previamente irradiada siguiendo una adaptación del protocolo descrito por Dario Campana (Fujisaki et al., 2009, Garg et al., 2012). Esta línea procede de la línea celular de leucemia mieloide crónica K562, la cual ha sido modificada para expresar de manera constitutiva en membrana la proteína 41BBL (o CD137L), ligando del receptor CD137 de células NK, y la proteína interleuquina-15 (IL-15). La interacción de estas dos proteínas con sus respectivos receptor y ligando en células NK estimula la activación y la proliferación de éstas últimas.

Se prepararon las células K562-mb15-41BBL para irradiación. Se realizó un recuento del número de células presentes en el cultivo y se tomó un número de células total 1,5 veces superior al de CMSPs obtenido. Se efectuó un lavado con PBS para eliminar el medio de cultivo. Para ello, se centrifugó 10 mins a 1500 rpm y se retiró el sobrenadante. Se resuspendió las células en el mismo medio que las CMSPs a una concentración de  $1.10^6$ /ml en frascos de cultivo (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) que admitían un volumen máximo de 20 ml. Se llenaron los frascos por completo para evitar la presencia de una fase de aire en el frasco. Se irradiaron las células con una dosis de 100 Greys de rayos-X (tasa de irradiación 600 unidades de monitor/min) con un acelerador lineal UNIQUE performance (Varian Medical Systems, Palo Alto, CA, Estados Unidos).

### 2.1.1. Cocultivo

Una vez irradiadas las células K562-mb15-41BBL, se procedió al cocultivo con CMSPs. Al encontrarse tanto las CMSPs como las K562-mb15-41BBL a misma concentración y en el mismo medio de cultivo, se transfirieron directamente a un frasco de cultivo con membrana hidrofóbica. Se mantuvieron en cultivo a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 21 días durante los cuales se realizó recuento celular cada 48 horas y se añadió medio fresco, si necesario, para mantener una concentración constante de células viables de  $1.10^6$  células/ml. Se determinó el porcentaje de células NK presente en el

cultivo a día 0, día 7 y día 14. Adicionalmente, a día 21 de cocultivo, se efectuó la caracterización final del perfil de receptores de membrana de NKAЕ (ver punto 3.3.1.).

Se realizaron observaciones de los cultivos en un microscopio Nikon Eclipse TS100 (Nikon, Tokio, Japón) equipado con una cámara CCD DS-Fi2, un objetivo LWD 40X /0.55 Ph1 ADL  $\infty$ /1.2 WD 2.1 y un objetivo 10X/0.25 Ph1 ADL  $\infty$ /1.2 WD 6.2. Como soporte informático se utilizó el programa NIS Elements (Nikon, Tokio, Japón).

### 3.3. Caracterización de células NK y NKAЕs

#### 3.3.1. Citometría de flujo

Se caracterizó el perfil de receptores de superficie de células NK en estado basal (previo a la expansión) y el perfil de expresión al finalizar la expansión de NKAЕs mediante inmunofluorescencia directa con anticuerpos primarios acoplados a fluoróforo. Se utilizó un citómetro FACSCanto™ II (Becton Dickinson and Company BD Biosciences, San Jose, CA, Estados Unidos) equipado con 3 láseres: un diodo láser de estado sólido de 405 nm (violeta), un láser de estado sólido de 488 nm (azul) y un láser helio-neón de 633 nm (rojo), y con capacidad de detección de 8 rangos de fluorescencia distintos. Los láseres excitan los fluoróforos conjugados a cada anticuerpo unido a la célula (denominada evento), la longitud de onda de emisión es detectada por filtros dicróicos (que permiten el paso de un rango de longitudes de onda y redirigen el resto hacia otros filtros) y por filtros de paso de banda (que recogen un rango determinado de longitudes de onda) con diferente rango de detección para cada láser. La señal lumínica recogida por los filtros llega hasta unos fotomultiplicadores, a los que se les aplica una corriente eléctrica, que amplifican la señal convirtiéndola a su vez en una señal eléctrica. Ésta última es la señal cuantificada por el sistema y será proporcional a la cantidad de anticuerpo unido a cada evento detectado. Las características de los anticuerpos utilizados se encuentran descritas en la tabla 3. Se emplearon los siguientes fluoróforos: isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), proteína clorofila peridina cianina 5.5 (PerCP/Cy5.5), ficoeritrina cianina 7 (PE/Cy7), aloficocianina (APC) y aloficocianina cianina 7 (APC/Cy7).

Antígeno	Dilución	Clon	Fluorocromo	Procedencia
CD3	1:100	UCHT1	PE/Cy7	Biolegend (San Diego, CA, Estados Unidos)
CD7	1:100	CD7-6B7	FITC	Biolegend (San Diego, CA, Estados Unidos)
CD16	1:100	3G8	APC/Cy7	BD Pharmingen™ (San Jose, CA, Estados Unidos)
CD19	1:100	SJ25C1	PE	Biolegend (San Diego, CA, Estados Unidos)
CD25	1:100	BC96	FITC	Biolegend (San Diego, CA, Estados Unidos)
CD31	1:100	WM59	FITC	Biolegend (San Diego, CA, Estados Unidos)
CD45	1:100	HI30	FITC	Biolegend (San Diego, CA, Estados Unidos)
CD56 (NCAM)	1:50	HCD56	APC	Biolegend (San Diego, CA, Estados Unidos)
CD69	1:100	FN50	PE	Biolegend (San Diego, CA, Estados Unidos)
CD178 (FasL)	1:100	NOK-1	PE	Biolegend (San Diego, CA, Estados Unidos)
CD253 (TRAIL)	1:100	RIK-2	PE	Biolegend (San Diego, CA, Estados Unidos)
DNAM-1 (CD226)	1:100	TX25	FITC	Biolegend (San Diego, CA, Estados Unidos)
NKG2A (CD159a)	1:100	#131411	PE	R&D Systems (Minneapolis, MN, Estados Unidos)
NKG2D (CD314)	1:100	1D11	PE	Biolegend (San Diego, CA, Estados Unidos)
NKp30	1:100	AF29-4D12	PE	Miltenyi (Bergisch Gladbach, Alemania)
NKp44	1:100	Z231	PE	lotest (Miami, FL, Estados Unidos)
NKp46	1:100	9E2	PE	Biolegend (San Diego, CA, Estados Unidos)
SLAMF7	1:100	162.1	PE	Biolegend (San Diego, CA, Estados Unidos)
Yoduro de propidio	5 µg/ml			Sigma Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos)

Tabla 3. Características y detalle de los anticuerpos utilizados para la citometría de células NK.



Para cada tubo de citometría se analizó un mínimo de 10.000 células de la población de interés, siempre que fuese posible. Tras obtención de CMSPs se realizó un recuento y se tomaron 100.000 células para cada tubo de citometría. Se lavó los tubos mediante centrifugación durante 3 mins a 1500 rpm a TA, y se reemplazó el medio por 100 µl de la combinación de anticuerpos correspondiente (tabla 4) para cada tubo diluidos en PBS con 3 mM de EDTA, 3% de PBS y 0,002% de azida sódica (PEF) para evitar la agregación y la contaminación de las muestras. Se añadió 100 µl por tubo de citometría.

Se realizó una incubación durante 15 mins a TA y en oscuridad. Posteriormente, se centrifugó 3 mins a 1500 rpm para eliminar el excedente de anticuerpo. En el caso de CMSPs recién aisladas de SP se procedió a realizar una lisis de eritrocitos con 200 µl de tampón de lisis (Quicklysis™, Cytognos, Salamanca, España) durante 20 mins en oscuridad y TA, se realizó un lavado durante 3 mins a 1500 rpm y se resuspendió cada tubo en 100 µl de PEF para su posterior análisis.

Para estos experimentos, se utilizó la siguiente estrategia de análisis: se excluyó los dobletes y mediante yoduro de propidio (PI) se excluyó las células no viables. Posteriormente, se seleccionó los linfocitos, que constituían la población de interés, en función de la medida de la dispersión frontal (*forward scatter channel*, FSC) y de la medida de la dispersión lateral (*side scatter channel*, SSC), y se delimitó la población de células NK mediante selección de la población CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>. Se cuantificó el porcentaje de células CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> y el porcentaje de células positivas para cada receptor de interés en la población CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>. Paralelamente, se caracterizaron las subpoblaciones de células NK<sup>bright</sup> CD56<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> y NK<sup>dim</sup> CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>.

En cada experimento se realizó un control negativo en ausencia de marcaje con el fin de determinar los voltajes concretos a aplicar para ajustar los valores negativos para cada población celular y fluoróforo. Los anticuerpos utilizados se unen a la fracción constante (Fc) de los receptores de interés, produciéndose una unión saturable de alta afinidad. Sin embargo, también puede producirse una unión inespecífica de baja afinidad y no saturable en las regiones variables. Ésta contribuye a la fluorescencia final emitida al combinar diversos anticuerpos acoplados a distintos fluoróforos en un mismo

tubo. Debido a ello, adicionalmente, en cada experimento se realizaron controles denominados *fluorescence minus one* (FMO). Este tipo de control permite evaluar la unión inespecífica que se produce en nuestros receptores de interés en ausencia del anticuerpo específico y en presencia de los otros anticuerpos que conforman el panel diseñado. De este modo, podremos estimar la contribución real de nuestro marcaje específico en la fluorescencia total emitida.

Láser	488 nm				633 nm	
Detector	FITC	PE	PerCP/Cy5.5	PE/Cy7	APC	APC/Cy7
<b>Tubo 1 Control Negativo</b>	NADA	NADA	NADA	NADA	NADA	NADA
<b>Tubo 2 FMO PE</b>	CD45	NADA	PI	CD3	CD56	CD16
<b>Tubo 3 FMO FITC</b>	NADA	NKp46	PI	CD3	CD56	CD16
<b>Tubo 4</b>	CD45	CD19	PI	CD3	CD56	CD16
<b>Tubo 5</b>	CD25	CD69	PI	CD3	CD56	CD16
<b>Tubo 6</b>	CD31	NKG2A	PI	CD3	CD56	CD16
<b>Tubo 7</b>		NKp46	PI	CD3	CD56	CD16
<b>Tubo 8</b>		NKp44	PI	CD3	CD56	CD16
<b>Tubo 9</b>		NKp30	PI	CD3	CD56	CD16
<b>Tubo 10</b>	DNAM-1	CD178	PI	CD3	CD56	CD16
<b>Tubo 11</b>	CD7	TRAIL	PI	CD3	CD56	CD16
<b>Tubo 12</b>		NKG2D	PI	CD3	CD56	CD16
<b>Tubo 13</b>		SLAMF7	PI	CD3	CD56	CD16

Tabla 4. Panel de anticuerpos utilizados para el análisis de receptores de superficie de células NK y NKAЕ.

La recogida y el análisis de los datos se realizó con el programa informático BD FACSDiva™ v8 (Becton Dickinson and Company BD Biosciences, San Jose, CA, Estados Unidos).

### 3.3.2. Inmunofluorescencia indirecta de NKG2D y NKp30

Inicialmente, se recubrieron los cubreobjetos (Menzel-Glaser; Braunschweig, Alemania) utilizados con poli-L-lisina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) a 50 µg/ml durante 30 mins a 37° C en incubador para favorecer la adhesión de las células. Se lavó la poli-L-lisina con 500 µl de PBS para eliminar el exceso. Paralelamente, se enfrentaron células NKAЕ con células de MM RPMI-8226 en suspensión durante 15 mins a una ratio 1:2 para favorecer la formación de sinapsis inmunológicas que pudieran ser visualizadas. Se sembró el número de células indicado (300.000 en el caso de células de MM y 150.000 en el caso de NKAЕs previamente enfrentados) en los cubreobjetos de 12 mm de diámetro esterilizados en medio RPMI 1640 completo.

Se fijaron las células mediante la adición de paraformaldehído (Merck, Darmstadt, Alemania) al 4% durante 10 minutos a TA. Se realizaron 3 lavados con PBS con MgCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O y CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O para favorecer la adhesión. Seguidamente, se permeabilizaron las células con Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) al 0,25 % en PBS durante 3 mins a TA. Se realizaron de nuevo 3 lavados de 5 mins con PBS. Los sitios de unión inespecíficos se bloquearon con una solución que contenía Image-IT FX Signal Enhancer (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) y y globulina humana a 100 µg/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) para bloquear las fracciones Fc. Se incubaron 30 mins en cámara húmeda a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>, al finalizar se eliminó el bloqueo sin lavar.

Posteriormente se realizó el marcaje con el anticuerpo primario monoclonal para NKG2D sintetizado en ratón (Biolegend, San Diego, CA, Estados Unidos, dilución 1/200) incubándolo en PBS a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 30 mins. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 mins por difusión con PBS para eliminar los restos de anticuerpo no unido.

Por último, se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente (IgG) en PBS a una dilución 1/200. El anticuerpo secundario se une a la Fc del anticuerpo primario y se encuentra acoplado al fluoróforo Alexa Fluor 488 (Molecular Probes-Invitrogen Corporation Carlsbad, CA, Estados Unidos) que emite fluorescencia a una longitud de onda de 519 nm. A la mezcla se añadió también 0,5 µg/ml de 4,6-diamidino-2-fenilindol 2 HCl (DAPI, Molecular Probes-Invitrogen Corporation Carlsbad, CA, Estados Unidos)

para visualizar los núcleos celulares a una longitud de onda de 461 nm. La incubación se realizó a 37° C, 5% de CO<sub>2</sub> y en oscuridad durante 30 mins. Una vez finalizada la incubación, se realizaron 3 lavados de 5 mins con PBS y 2 últimos lavados con agua desionizada para eliminar las sales del PBS. El mismo proceso se realizó para el marcaje de NKp30 con el anticuerpo primario monoclonal para NKp30 sintetizado en ratón (Biolegend, San Diego, CA, Estados Unidos, dilución 1/200).

Paralelamente, se realizó un control negativo en el que no se añadió anticuerpo primario, con ello se comprobó que la tinción observada era específica y que no se debía al fondo inespecífico producido por el fluoróforo acoplado al anticuerpo secundario utilizado.

Por último, las preparaciones se montaron sobre un portaobjetos (Menzel Gläser, Braunschweig, Alemania) utilizando un medio de montaje acuoso rico en glicerol Prolong Gold Antifade Reagent (Molecular Probes-Invitrogen Corporation Carlsbad, CA, Estados Unidos).

### 3.3.3. Microscopía confocal

La observación de las preparaciones se realizó con un microscopio confocal espectral Leica TCS SP5 (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Alemania) dotado con AOBs (*acousto-optical beam splitter* / divisor de haz acústico-óptico), un objetivo de inmersión en aceite HCX PL APO 63X NA (apertura numérica) 1.4, varias líneas de láser visibles: un diodo violeta de 405 nm, un diodo amarillo de 561 nm, un láser de estado gaseoso de argón con emisión en 488 nm y un láser de estado gaseoso de helio-neón de 633 nm, así como un láser multifotón (Spectra-Physics). Como soporte informático, se utilizó el programa Leica Application Suite Advanced Fluorescence y para el análisis de las imágenes se utilizó el programa Fiji/ImageJ (Schindelin et al., 2012, Schneider et al., 2012).

La microscopía confocal permite el estudio de muestras con marcaje fluorescente, pero realizando secciones ópticas finas de las mismas. La captura se realiza excitando la muestra punto a punto con el láser y recogiendo la emisión correspondiente para cada punto. La longitud de onda de emisión de esa muestra es mayor a la de excitación, y esta

última pasa por un pequeño diafragma permitiendo la excitación de un único plano focal. De modo que toda la información fuera de ese plano es filtrada y eliminada consiguiendo así una imagen de mayor calidad (mayor ratio señal/ruido) que la de la microscopía de epifluorescencia convencional. El seccionamiento óptico unido a la captura de un conjunto de planos permite hacer reconstrucciones tridimensionales de la muestra para poder observar detalles que de otra forma no sería posible.

### 3.4. Estudios de función celular

Se estudió la actividad citotóxica de las células NKAЕ, obtenidas tras 21 días de cocultivo con la línea K562-mb15-41BBL, frente a diferentes líneas celulares de mieloma múltiple (U-266, L-363 y OPM-2) y frente a la célula tumoral clonogénica de líneas de mieloma múltiple (RPMI-8226, L-363, OPM-2 y JJN-3). Se comparó la actividad de las NKAЕs con la de NKs de pacientes con MM y la de NKs de donantes.

#### 3.4.1. Citotoxicidad en suspensión

Se realizó el protocolo basado en europio-TDA de Perkin Elmer (Delfia®, Perkin Elmer, Waltham, MA, Estados Unidos). Una primera parte consistió en preparar las células efectoras, ya fuesen CMSPs o NKAЕs. Tras obtención de CMSPs y NKAЕs tal y como se ha detallado anteriormente (en los puntos 3.1. y 3.2.1. respectivamente), éstas fueron lavadas con PBS y resuspendidas en medio RPMI 1640 completo. Se apartó una alícuota para la determinación del porcentaje de células NK por citometría de flujo (CMF) y se realizó un recuento con azul tripán. Una vez determinado el número de células presente y el porcentaje de células NK/NKAЕ, se calculó el volumen necesario para preparar una concentración de células NK/NKAЕ de  $1,6 \cdot 10^6$ /ml. Las subsecuentes concentraciones se prepararon mediante la realización de diluciones seriadas  $\frac{1}{2}$  hasta una concentración  $1 \cdot 10^5$ /ml.

Simultáneamente, se prepararon las células diana, en este caso células procedentes de líneas celulares de MM en cultivo. Se prepararon  $2 \cdot 10^6$  células totales a una concentración de  $1 \cdot 10^6$ /ml y se incubaron durante 35 mins a 37° C con 5 µl del ligando acetoximetil ester para potenciación de la fluorescencia (BATDA, Perkin Elmer,

Waltham, MA, Estados Unidos) previamente atemperado. Este compuesto es altamente liposoluble y penetra con facilidad a través de la membrana celular en el interior de las células de MM. Una vez dentro, es hidrolizado por las acetil esterasas intracelulares convirtiéndose en un ligando hidrofílico (TDA) de modo que ya no puede atravesar la membrana y queda retenido en el interior celular. Tras la incubación se realizaron 3 lavados con PBS; un primer lavado de 10 mins a 1200 rpm y 2 lavados posteriores de 5 mins, renovando el PBS en cada uno de ellos. Se realizó un recuento final de células diana y se prepararon 10 ml en medio RPMI 1640 completo a una concentración de  $5 \cdot 10^4$  células/ml.

Se utilizó una placa de 96 pocillos con fondo en U para enfrentar 100  $\mu$ l de células CMSP o NKAe con 100  $\mu$ l de células diana de MM para cada concentración de CSMPs/NKAes por triplicado, suponiendo las siguientes ratios: 32:1, 16:1, 8:1, 4:1 y 2:1. Se incubaron durante 2 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido ese tiempo se centrifugó la placa 10 mins a 1500 rpm y se transfirió 20  $\mu$ l de sobrenadante de cada pocillo a una placa de 96 pocillos de fondo plano (Delfia®, Perkin Elmer, Waltham, MA, Estados Unidos) que contenía 200  $\mu$ l de solución de europio en cada pocillo. Posteriormente se incubó 15 mins a 37°C en agitación a 70 rpm. El TDA es liberado de las células de MM que han sido lisadas por las células NK/NKAe y al combinarse con el europio del medio forma un compuesto quelado estable y altamente fluorescente (EuTDA) que se excita a 340 nm y emite a 612 nm. Esta emisión es cuantificada mediante detección de fluorescencia en tiempo resuelto (TRF) que implica medir la fluorescencia emitida acumulada en un intervalo concreto de tiempo y no en un momento puntual. Se midió la fluorescencia con un lector de placas Victor (Victor X5 Multilable Plate Reader, Perkin Elmer, Waltham, MA, Estados Unidos). Como soporte informático se utilizó el programa WorkOut Plus MMD (Perkin Elmer, Waltham, MA, Estados Unidos), la fluorescencia emitida se representó como recuentos en unidades arbitrarias (U.A).

Se prepararon por triplicado los siguientes controles:

- Control del ruido de fondo: se tomó 1 ml de la dilución de células diana de MM y se centrifugó 10 mins a 1200 rpm, para cargar 100  $\mu$ l de sobrenadante y 100  $\mu$ l de medio RPMI 1640 completo. De este modo se cuantifica la fluorescencia emitida por los restos

de BATDA que no haya sido internalizado en las células y haya podido quedar en el medio.

- Medio: se añadieron 200 µl de medio para evaluar autofluorescencia propia de algún componente del medio, o alguna contaminación que pudiese interferir en los resultados.

- Liberación espontánea: se cuantificó la fluorescencia debida a las células diana que entran en necrosis o en apoptosis de manera espontánea debido al proceso de manipulación y no a la acción de las células NK/NKAE. Para ello, se añadieron 100 µl de células diana de MM y 100 µl de medio RPMI 1640 completo. Esta fluorescencia se restará del resultado obtenido en los pocillos de NKs/NKAEs vs células de MM.

- Liberación máxima: se añadieron 100 µl de células diana de MM, 50 µl de medio RPMI 1640 completo y 50 µl de tampón de lisis que contenía 0,03% de digitonina y 19% de dimetil sulfóxido (DMSO). Se resuspendieron las células vigorosamente para favorecer la lisis. De este modo se evaluó la fluorescencia emitida por el mayor número de células que se pudieran destruir, tomándose el valor obtenido como el 100% de fluorescencia.

Una vez determinada la fluorescencia emitida en cada pocillo, se obtuvo la media de los triplicados y se calculó el porcentaje de liberación espontánea y el porcentaje de liberación específica del siguiente modo:

- % de liberación espontánea:

$$\frac{\text{Liberación espontánea (recuento)} - \text{ruido de fondo (recuento)}}{\text{Liberación máxima (recuento)} - \text{ruido de fondo (recuento)}} \times 100$$

- % de liberación específica:

$$\frac{\text{Liberación experimental (recuento)} - \text{liberación espontánea (recuento)}}{\text{Liberación máxima (recuento)} - \text{liberación espontánea (recuento)}} \times 100$$

Se consideró que el experimento era representativo siempre que la liberación espontánea no contribuyese a la lisis total en más de un 50%.

#### 3.4.2. Ensayos clonogénicos

Este tipo de experimento nos permite evaluar qué proporción de células, ya sea de línea celular o de células primarias, poseen capacidad proliferativa y por lo tanto pueden crear una progenie de células tumorales. Para ello se siembran las células en metilcelulosa, un medio semisólido que limita el movimiento celular, de modo que las células presentes pueden dividirse, si poseen potencial proliferativo, pero no pueden desplazarse, por lo que las células hijas derivadas de las sucesivas divisiones se mantienen en el mismo lugar formando una colonia perceptible a simple vista.

Se prepararon las CMSPs y NKAes del mismo modo que para los experimentos de citotoxicidad en suspensión pero, en este caso, se llevaron a una concentración final de  $1,28 \cdot 10^6$  células/ml en medio RPMI 1640 completo y se realizaron sucesivas diluciones seriadas  $\frac{1}{2}$  para obtener las diferentes concentraciones y enfrentar las células a diferentes ratios 32:1, 16:1, 8:1, 4:1 y 2:1. Tras poner a punto la concentración de células diana de MM (procedentes de diversas líneas de MM) idónea, se prepararon las células a una concentración de  $4 \cdot 10^4$  células/ml simplemente realizando un lavado previo de las células en cultivo. Se enfrentaron 100  $\mu$ l de cada concentración de células efectoras (CMSPs o NKAes) a 100  $\mu$ l de células diana de MM en una placa de 96 pocillos con fondo en U. Se realizó un control negativo en el que sólo se añadieron 100  $\mu$ l de células CMSP/NKAE y 100  $\mu$ l de medio RPMI 1640 completo para comprobar la ausencia de crecimiento debido a infección bacteriana en la muestra de SP que pudiera interferir en los resultados. Como control positivo, se sembró un pocillo con 100  $\mu$ l de células de MM y 100  $\mu$ l de medio RPMI 1640 completo para determinar el crecimiento basal de las células de MM y poder así evaluar el efecto de la exposición previa a células NK o NKAes. Se centrifugó las células 10 segs a 500 rpm para favorecer el contacto entre las células efectoras y las células diana y, posteriormente, se incubó la placa durante 2 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.



Finalizado ese tiempo, se resuspendieron los 200 µl de cada pocillo mediante pipeta para favorecer el desprendimiento de las células que pudieran haber sedimentado y, seguidamente, se transfirieron a un tubo que contenía 3,8 ml de metilcelulosa sin citoquinas (Methocult™ H4230, Stemcell™ Technologies, Vancouver, Canadá) previamente preparada con medio RPMI 1640 a una proporción 4:1 (metilcelulosa: medio). Se resuspendió mediante agitación en vórtex y se reservó hasta la desaparición de las burbujas que se habían formado. Mediante el uso de una aguja de 18 G (BD™ Blunt Fill Needle, Huesca, España) acoplada a una jeringuilla de 5 ml (BD Discardit™ II, Huesca, España) se sembró 1 ml de metilcelulosa conteniendo la mezcla procedente de cada pocillo en una placa petri de 35 mm de diámetro por triplicado, y éstos a su vez en una placa de 100 mm de diámetro que contenía agua estéril para favorecer la presencia de un ambiente húmedo y evitar que la metilcelulosa se secase (figura 5). Se mantuvieron en cultivo a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 14 días, transcurrido ese plazo de tiempo, se realizó un recuento de las colonias visibles en cada placa. Se tomó el número de colonias obtenido para células de MM en estado basal como el 100% del crecimiento de colonias.

Se adquirieron imágenes representativas de cada condición con luz blanca en un transiluminador G:BOX Chemi XX6 (Syngene, Synoptics, Cambridge, Reino Unido), como soporte informático se utilizó el programa GeneSys (GeneSys image acquisition software, Syngene, Synoptics, Cambridge, Reino Unido).

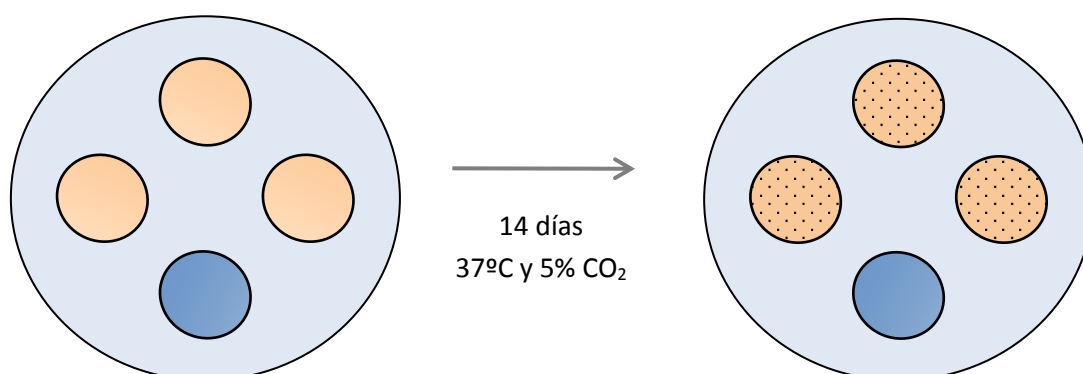


Figura 5. **Representación esquemática del proceso de siembra y cultivo de células clonogénicas de MM en metilcelulosa.** Cada pocillo se sembró por triplicado, se añadió una cuarta placa petri de 35 mm de diámetro con agua estéril para mantener la humedad.

### 3.4.3. Bloqueo de receptores

Se evaluó la implicación de los receptores NKG2D y NKp30 en la actividad citotóxica de las células NKAЕ mediante bloqueo de los mismos. Para ello, en los diferentes tipos de experimentos de función celular (experimentos de citotoxicidad y ensayos clonogénicos), una vez elaboradas las diferentes concentraciones de células NKAЕ se incubó la alícuota de mayor concentración con anticuerpo anti-NKG2D (Biolegend, San Diego, CA, Estados Unidos) y/o anti-NKp30 (Biolegend, San Diego, CA, Estados Unidos) cuyas concentraciones óptimas se pusieron a punto previamente; 10 µg/ml y 5 µg/ml respectivamente (Swift et al., 2012). La incubación tuvo una duración de 30 mins, a temperatura ambiente. Tras el proceso de bloqueo, se añadió PBS y se realizó un lavado mediante centrifugación de 5 mins a 1500 rpm para eliminar el exceso de anticuerpo. Se eliminó el sobrenadante para reemplazarlo por el mismo volumen inicial de medio RPMI 1640 completo nuevo.

Se utilizó un control de isotipo (IgG1 κ) para descartar la existencia de efectos debidos a la unión inespecífica de los anticuerpos. Este control se incubó en las mismas condiciones que el resto de anticuerpos utilizando la mayor concentración empleada, 10 µg/ml. Una vez finalizado el bloqueo se procedió a continuar los experimentos funcionales tal y como se ha descrito en los puntos anteriores.

### 3.4.4. Purificación de células NKAЕ

Para la ejecución de los experimentos de microscopía *in vivo* con NKs y NKAЕs fue necesario purificar las células NK a partir de CMSP, dado el pequeño porcentaje de éstas que suponen, y las NKAЕs a partir del cultivo para eliminar los restos de CMSPs y de componentes del medio que pudieran estar presentes. Se realizó la separación con un citómetro separador BD FACSAria™ III (BD Biosciences, San Jose, CA, Estados Unidos) equipado con 3 láseres: un diodo láser de estado sólido de 405 nm, un láser de estado sólido de 488 nm y un láser helio-neón de 633 nm. Se realizó la separación a una presión de 45 psi (*pounds-force per square inch*) y con un *nozzle* de 85 µm. Se separaron las

células en modo de pureza (configuración de máscaras: 32-32-0), con una eficiencia superior al 95%, para obtener una pureza final siempre superior al 90%.

Para que los anticuerpos utilizados no interfiriesen en los experimentos posteriores de microscopía *in vivo* se realizó una separación mediante selección negativa de las células de interés. Se realizó, en condiciones de asepsia, el mismo procedimiento de marcaje descrito en el apartado 3.3.1. Se empleó un marcaje con los siguientes anticuerpos: anti-CD3-PE/Cy7, anti-CD14-FITC (dilución 1:100, Biolegend, San Diego, CA, Estados Unidos), anti-CD19-PE, y la sonda vital DAPI (4 µg/ml), con los controles FMO apropiados. Se filtraron las muestras con un filtro de 30 µm (CellsTrics®, Sysmex Partec, Barcelona, España). Se seleccionó la población de interés por FSC y SSC, los singletes y las células viables DAPI<sup>-</sup>. Se descartaron las células CD3<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> y CD14<sup>+</sup>, eliminando así los linfocitos T, NKT, B y monocitos, y se seleccionó como NKs o NKAes las células negativas para los 3 marcajes. Las células se recogieron en medio RPMI 1640 completo con penicilina 5000 U.I./ml al 1%, estreptomicina 5000 µg/ml al 1% y anfotericina B 250 µg/ml al 1%. Se aisló un mínimo de  $2,5 \cdot 10^6$  NKAes y  $1,3 \cdot 10^6$  NKs procedentes de CMSPs de paciente con MM. Se dejaron reposar durante la noche en ambiente húmedo a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> para que las células se recuperasen del estrés producido por el proceso de separación.

#### 3.4.5. Microscopía *in vivo*

Se sembraron células de MM de la línea celular RPMI-8226 en una cámara de flujo de 6 canales tratados con una cobertura de polímero (Ibidi, Martinsried, Alemania). En cada canal se sembraron 100 µl de células de MM en medio RPMI 1640 completo con antibióticos a una concentración de  $1 \cdot 10^6$  células/ml. Se puso a punto la concentración adecuada para que las células formaran una monocapa. Se dejaron reposar durante la noche en ambiente húmedo, a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> para que las células se adhiriesen a la base del canal.

Para la configuración del experimento se empleó un sistema de microfluídica (Elveflow, Plug and Play microfluidics, Roubaix, Francia) compuesto por un controlador de presión OB1 con dos canales de presión, un sistema de válvulas MUX de 10 canales,

tubos capilares de PTFE 1/16" diámetro externo (OD) x 1/32" diámetro interno (ID), tubos de silicona de 0,5 mm de ID y conectores/adaptadores para hacer las conexiones. Se prepararon las células NK/NKAE a una concentración de  $0,5 \cdot 10^6$  células/ml en medio RPMI 1640 completo con antibióticos. Se realizó un lavado de 5 mins con medio RPMI 1640 completo previamente al establecimiento del flujo con las células. Posteriormente, se estableció un flujo constante durante 20 mins que permitía que las células NK y NKAE rodasen sobre la monocapa de células RPMI-8226 (simultáneamente cada una en un canal diferente). Se realizó un segundo lavado con medio durante 5 mins y se estableció un flujo común en los dos canales durante 2 horas para evaluar la necrosis de las células de MM producida por las NKs/NKAEs.

Se visualizó con un microscopio Leica AF6000W equipado con ruedas de filtro externas rápidas, una cámara CCD ORCA R2 Hamamatsu, un sistema de autofocus AFC y un objetivo HC PL FLUOTAR 20X Dry NA 0.5 (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Alemania). Como soporte informático, se utilizó el programa Leica Application Suite Advanced Fluorescence, tomándose imágenes cada minuto en 4 posiciones diferentes en cada canal. Para el procesamiento de las imágenes se utilizó el programa Fiji/ImageJ.

Se cuantificó el número de células que entraban en apoptosis/necrosis durante las dos horas de observación realizando un recuento en las 4 posiciones de cada canal.

### 3.5. Estudios de seguridad

Con el fin de evaluar la seguridad de las células NKAE obtenidas en cultivo, se estudiaron los niveles de expresión de *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog* (c-Myc) y de la telomerasa humana (hTERT) por ser considerados protooncogenes. Asimismo, se analizaron los niveles de expresión de *breakpoint cluster region-Abelson tyrosine-protein kinase* (BCR-ABL), dado el origen de la línea K562-mb15-41BBL utilizada para el crecimiento de las NKAEs. Finalmente, se estudió también la actividad citotóxica de estas células frente a linfocitos sanos, así como frente a progenitores hematopoyéticos sanos de médula ósea para evaluar la posible toxicidad de las NKAEs.

### 3.5.1. Extracción de ARN

Se extrajo el ARN con el kit de extracción “All Prep DNA/RNA Micro Kit” (Qiagen, Hilden, Alemania). Las muestras de CMSPs fueron aisladas mediante el método previamente descrito (ver punto 3.1.) y se tomó una alícuota para analizar una muestra del día 0 previo a la expansión de NKAes. Asimismo, se tomaron muestras de los días 14 y 21 de expansión de NKAes para su análisis.

Se adaptó el protocolo propuesto por la casa comercial. La separación se realizó en base a la tecnología de separación en membrana de sílica gel. Este tipo de membrana permite la unión y elución de ácidos nucleicos modificando las condiciones iónicas del medio. Se resuspendieron las muestras a analizar en 350 µl de tampón de lisis RLT Plus suplementado con β-mercaptoetanol 14,3 M (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) al 1%. Este tampón es altamente desnaturizante y rico en guanidina-isotiocianato que produce una inactivación inmediata de las ribonucleasas (RNasas) y desoxirribonucleasas (DNasas) presentes para asegurar el correcto aislamiento del ARN/ADN sin que se produzca ningún cambio indeseado en el perfil de expresión génica. A su vez, el β-mercaptoetanol es un agente antioxidante y reductor que favorece la estabilidad de las muestras reduciendo la oxidación, evitando así la formación de estructuras secundarias que puedan afectar al material genético. Este tampón permite la conservación de los lisados celulares a -80º C hasta su utilización, momento en el cual se descongelaron los viales. Antes de realizar la extracción, se homogeneizaron las muestras pasándolas 5 veces por una aguja de 21 G (BD Eclipse™ Temse, Bélgica) acoplada a una jeringuilla de 1 ml (Caress®, Pescara, Italia).

El homogeneizado obtenido se transfirió a una columna AllPrep DNA introducida en un tubo colector de 2 ml. Esta columna posee una membrana de sílica gel que permite la retención del ADN mediante cromatografía de adsorción, de modo que al centrifugar 30 segundos a 12.000 rpm se consigue eluir el ARN y proteínas y retener el ADN en la columna. Ésta es desechada o reservada a 4º C para la posterior purificación de ADN. Se añadió al eluido el mismo volumen de etanol al 70% (etanol absoluto en agua libre de RNasas, AppliChem Panreac Química SLU, Barcelona, España). Se resuspendió varias

veces y se transfirió la mezcla a una columna RNeasy MinElute introducida en un nuevo tubo de recogida de 2 ml. El etanol genera las condiciones necesarias para la unión del ARN a la membrana de sílica gel. Se realizaron varios pasos de lavado y centrifugación tal y como indica el protocolo. Finalmente, se reemplazó el tubo colector y se añadió en el centro de la membrana de la columna 16 ml de agua libre de RNasas, se dejó reposar durante 1 min para, seguidamente, centrifugar 1 min a máxima velocidad para recuperar el ARN purificado. Este paso se realizó por duplicado para recuperar la mayor cantidad posible de ARN.

Se midió la absorbancia (abs) a 260 nm en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Thermo Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) para cuantificar la cantidad de ARN obtenido. Por otra parte, la pureza del ARN se evaluó a partir de la ratio entre la abs a 260 nm y la abs a 280 nm (longitud de onda de absorción de las proteínas). Se asumió que aquellas muestras cuyos valores se encontraban entre 1,8 y 2, no contenían una cantidad relevante de proteínas, siendo por lo tanto muestras de ARN de buena calidad. Las muestras se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### 3.5.2. Transcripción inversa de ARN

Tras la purificación, se llevó a cabo la transcripción inversa (RT) del ARN para la obtención de ADN monocatenario complementario (ADNc) utilizando el kit comercial “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, Estados Unidos). En primer lugar, se realizó en frío una adaptación de la mezcla de reacción descrita en el kit, calculando el volumen necesario para el total de muestras y réplicas a analizar. Para ello, se utilizó una mezcla de oligodesoxirribonucleótidos aleatorios como cebadores, siendo la mayoría de ellos hexámeros, a  $3\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , una mezcla de cuatro desoxirribonucleótidos a 100 mM (desoxiadenosina trifosfato [dATP], desoxicitidina trifosfato [dCTP], desoxiguanosina trifosfato [dGTP], desoxitimidina trifosfato [dTTP]), la transcriptasa inversa RNasa H MultiScribe™ que corresponde a la enzima del virus de la leucemia murina de Moloney recombinante (rMoMuLV) optimizada (50 unidades/ $\mu\text{l}$ ). Se añadió también un inhibidor de RNasa para prevenir la degradación del ARN molde.

La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) sometiendo las muestras a las condiciones establecidas por el fabricante:

- Paso 1: 10 mins a 25º C.
- Paso 2: 120 mins a 37º C.
- Paso 3: 5 mins a 85º C.
- Paso 4: mantenimiento a 4º C.

### 3.5.3. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

El ADNc resultante se amplificó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para poder cuantificar la expresión de BCR-ABL, tomando como gen control el gen ABL. Este gen codifica para la proteína ABL1 que se encuentra involucrada en funciones básicas en la supervivencia celular, posee una expresión constitutiva y, por lo tanto, su expresión es invariable, lo que lo convierte en un control interno idóneo. La línea K562-mb15-41BBL procede de la línea celular K652 de leucemia mieloide crónica, resulta sencillo detectar la presencia de restos de esta línea celular en el producto final de NKAes mediante detección y cuantificación de la expresión de BCR-ABL en los diferentes puntos temporales de crecimiento de las NKAes.

La reacción de PCR cuantitativa (qPCR) se basa en la tecnología Taqman que consiste en la utilización de una sonda. Estas sondas están formadas por oligonucleótidos de ADN que llevan unido un fluoróforo denominado “*reporter*” en el extremo 5’, como la 6-carboxifluoresceína (FAM™, que se excita a 494 nm y emite a 517 nm), y en el extremo 3’ una molécula denominada “*quencher*”. La sonda está formada por una secuencia de nucleótidos que se une a la zona intermedia del amplicón. Mientras los dos fluoróforos se encuentran cercanos y unidos a esa secuencia, y el láser excita el fluoróforo, la emisión producida por el “*reporter*” se reduce debido al “*quencher*” mediante un fenómeno de transferencia energética de fluorescencia por resonancia (FRET). Cuando la replicación comienza y la polimerasa llega a la zona de unión de la sonda, mediante su actividad 5’ exonucleasa, escinde la unión de la sonda al

ADN monocatenario para poder completar la replicación de la hebra de ADN. De este modo, el fluoróforo “*reporter*” es liberado y se separa del “*quencher*”, momento en el cual deja de producirse el fenómeno FRET y se produce la emisión de fluorescencia del “*reporter*”, ésta es detectada en cada nuevo ciclo de replicación del ADN y es proporcional al número de moléculas de ADN que se producen.

El protocolo empleado para la realización de la reacción de PCR cuantitativa para BCR-ABL, así como los cebadores utilizados son los establecidos por el Programa Europeo contra el Cáncer y descritos por J. Gabert (Gabert et al., 2003) para la detección de enfermedad residual en leucemia. Como resumen, la reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador para PCR en tiempo real ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System (Life Technologies, Carlstad, CA, Estados Unidos). Se realizó la mezcla de reacción que contenía para cada muestra: 0,5 µl del cebador sentido a 10 µM, 0,5 µl del cebador antisentido a 10 µM para BCR-ABL o ABL, 0,4 µl de la sonda Taqman para la detección mediante fluorescencia a 4 µM (TIPMOLBIOL, Berlín, Alemania), 5 µl de “Taqman Fast Advanced PCR Master Mix” mezcla compuesta por la ADN polimerasa rápida AmpliTaq®, uracilo-ADN glicosilasa (para eliminar los uracilos previamente incorporados y así evitar la reamplificación de cualquier ARN residual), dNTPs (con dUTPs), cloruro de magnesio a 3 mM, y ROX como referencia pasiva para no confundir el ruido de fondo, y, finalmente, 2,6 µl de agua Ultraspec™ (Biotechx, Houston, Estados Unidos). Se dispensó la mezcla de reacción en cada pocillo en una placa de 96 pocillos (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, Estados Unidos) realizándose todas las muestras por duplicado o por triplicado cuando fuera posible. Se añadió 1 µl de ADNc a la mezcla constituyendo un volumen total de reacción de 10 µl. Los detalles de los protocolos de amplificación se detallan en la tabla 5 y la figura 6.

Como soporte informático se utilizó el programa SDS 2.2.2. Se utilizó un plásmido calibrador con número de copias conocido (Ipsogen, Qiagen, Hilden, Alemania) para establecer una curva estándar y poder determinar el número de copias exacto de BCR-ABL. La expresión relativa de BCR-ABL se calculó en base a los valores de ciclo umbral (Ct, número de ciclos necesario para detectar una señal y directamente proporcional a la cantidad de material genético de interés presente) obtenidos mediante normalización con el gen ABL. Asimismo, se empleó el sistema internacional Programa Eutos, para



aplicar el factor de corrección en función de la calibración de la máquina (Hughes et al., 2006).

	BCR-ABL	ABL
Cebador sentido	5'-TCCGCTGACCATCAAYAAGGA-3'	5'-TGGAGATAA CACTCTAAGCATAACTAAAGGT-3'
Cebador antisentido	5'-CACTCAGACCCTGAGGCTCAA-3'	5'-GATGTAGTTGCTTGGGACCCA-3'
Sonda Taqman	5'-6FAM-CCCTTCAGCGGCCAGTAGCATCTGA-TMR	5'-6FAM-CCATTTTGGTTGGGCTTCACACCATTXT-PH
Amplicón	Dos transcritos: 147 y 72 pbs	123 pbs

Tabla 5. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para los dos genes y tamaño del amplicón obtenido en pares de bases (pbs).

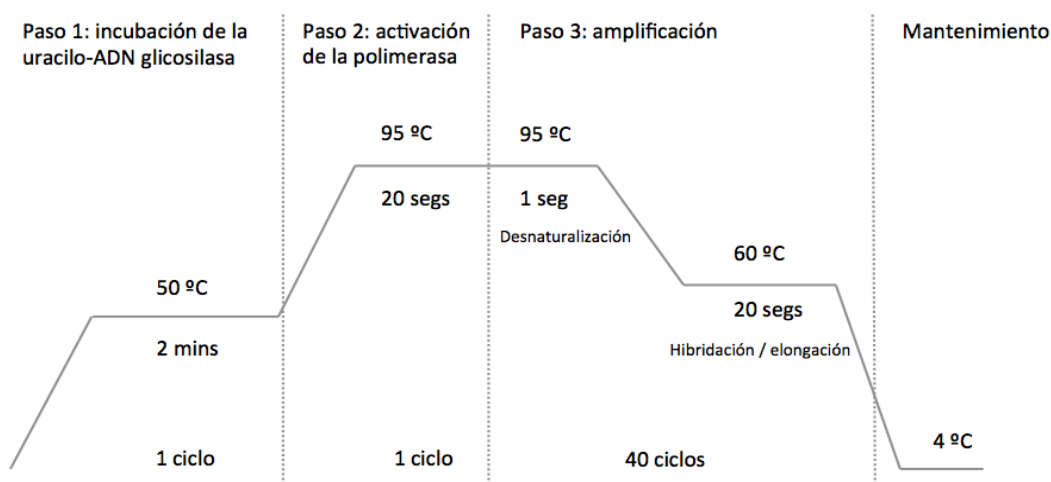


Figura 6. Protocolo de amplificación para el gen BCR-ABL y para el gen control ABL.

Para el estudio de la expresión de c-MYC y hTERT se empleó la misma tecnología y procedimientos que para el estudio de BCR-ABL salvo ciertas variaciones que se detallan a continuación. Se utilizaron cebadores y sondas prediseñados denominados

ensayos de PCR en tiempo real Taqman (*"Taqman gene expression assay"*) siguiendo los protocolos indicados por el fabricante. Como control interno se utilizó el gen de la  $\beta$ -glucuronidasa ( $\beta$ GUS), cuya expresión es constitutiva e invariable. Se realizó la mezcla de reacción que contenía los siguientes reactivos por cada pocillo: 5  $\mu$ l de *"Taqman gene expression master mix"* (compuesto por la polimerasa AmpliTaq Gold® ultra pura, uracilo-ADN glicosilasa, cloruro de magnesio 3 mM, dNTPs y ROX), 0,5  $\mu$ l de *"Taqman gene expression assay"* (para c-Myc, hTERT o  $\beta$ GUS según corresponda, la mezcla contiene 18  $\mu$ M de cada cebador y 5  $\mu$ M de la sonda), 2,5  $\mu$ l de agua libre de RNasas y, por último, se añadió a cada pocillo 2  $\mu$ l de ADNc de cada muestra a analizar. Los detalles del protocolo de amplificación empleado se especifican en la figura 7. Los amplicones obtenidos tenían un tamaño de 107 pbs para c-MYC, 79 pbs para hTERT y 96 pbs para  $\beta$ GUS.

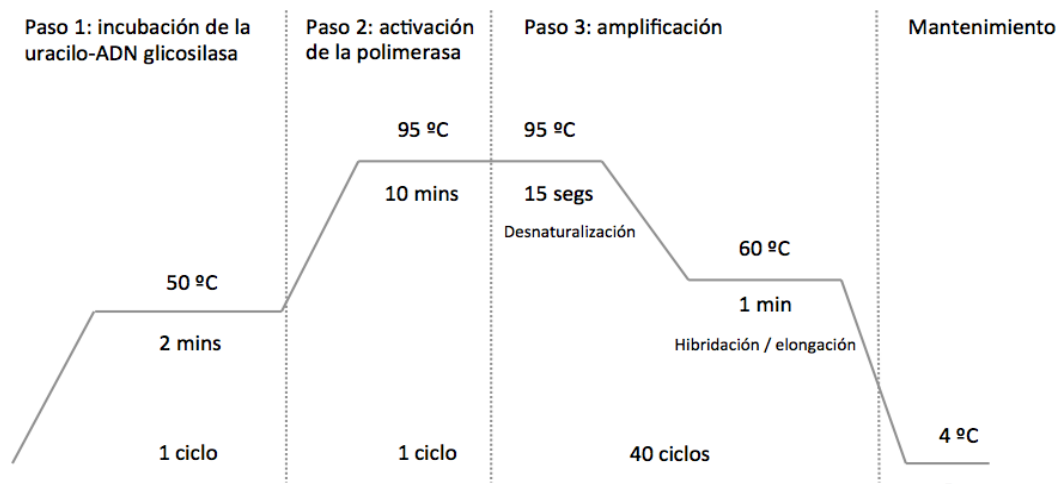


Figura 7. **Protocolo de amplificación para los genes c-MYC, hTERT, y para el gen control  $\beta$ GUS.**

Se cuantificó la expresión relativa siguiendo el modelo de cálculo propuesto por Michael W. Pfaffl (Pfaffl, 2001). La eficiencia de la PCR se calculó realizando una curva estándar utilizando como calibrador la línea celular RPMI-8226.

### 3.5.4. Estudios funcionales frente a células de médula ósea sana

Para estudiar el efecto que las células NKAЕ pudiesen tener sobre células sanas de médula ósea y sobre la célula progenitora hematopoyética CD34+ sana se realizaron los experimentos funcionales anteriormente descritos en el apartado 3.4. utilizando como células diana células procedentes de médula ósea sana. Inicialmente, se realizaron experimentos para evaluar la actividad citotóxica en suspensión de células NKAЕ enfrentadas a células mononucleares procedentes de MO sana. Se procesó la MO sana del siguiente modo: se diluyó la muestra de MO en un volumen equivalente de PBS en una placa petri de 35 mm, y se deshicieron los grumos que pudieran existir pasando la muestra repetidas veces por una aguja de 21 G acoplada a una jeringuilla de 5 ml. Seguidamente, se realizó una centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Paque™ Plus a una ratio 2:1. Se tomó el anillo de células mononucleares y se lavó con PBS. Posteriormente, se hizo un recuento de células mononucleares de MO para comenzar la incubación con BATDA y continuar el proceso de estudio de citotoxicidad descrito (punto 3.4.1.).

Por otro lado, se realizó una separación de progenitores hematopoyéticos CD34+ a partir de células mononucleares de MO sana con un separador celular FACSaria™ Fusion equipado con 3 láseres: un diodo láser de estado sólido de 405 nm, un láser de estado sólido de 488 nm y un láser helio-neón de 633 nm. Se realizó el protocolo de marcaje para citometría de flujo previamente descrito. Se utilizó un anticuerpo anti-CD34-BV421 (dilución 1:100, Biolegend, San Diego, CA, Estados Unidos) y yoduro de propidio a 5 µg/ml. Se descartaron los dobletes y las células no viables para posteriormente seleccionar las células CD34<sup>+</sup>. Se realizó la separación en modo de pureza modificado (máscaras:0-32-0) con una eficiencia siempre superior al 85%. Las células se recogieron en medio Iscove modificado por Dubelcco (IMDM) y se obtuvo una pureza superior al 96%. Las células CD34<sup>+</sup> obtenidas se utilizaron como células diana para la realización de ensayos clonogénicos. Se enfrentaron 2000 células CD34<sup>+</sup> en 100 µl de IMDM completo a 100 µl de cada concentración de células NKAЕ, durante 2 horas a 37° C y 5 % de CO<sub>2</sub>, y posteriormente, se completó el protocolo descrito en el punto 3.4.2. sembrando las células en metilcelulosa completa con citoquinas (Methocult Express, Stemcell™ Technologies, Vancouver, Canadá).

## 4. CARACTERIZACIÓN DE SIDE POPULATION DE MIELOMA MÚLTIPLE

### 4.1. Caracterización de *side population*

El marcaje para poner en evidencia la presencia de *side population* en una muestra se basa en la incubación con una sonda denominada sonda de ciclo violeta (DCV, Molecular Probes-Invitrogen Corporation Carlsbad, CA, Estados Unidos) para la cual la célula es permeable. Esta sonda posee afinidad por los pares de bases AT del ADN. La excitación del DCV con un láser violeta produce la emisión en dos longitudes de onda distintas (en azul a 437 nm y en rojo a 650 nm). Al visualizar esas dos emisiones conjuntamente en un gráfico de puntos permite ver las poblaciones en función de la fase del ciclo celular en la que se encuentren. En el caso de células madre, éstas poseen mayor cantidad de bombas ATP-binding cassette (ABC) en su membrana en comparación con el resto de células, y expulsan de manera muy eficiente la sonda incorporada, por lo que pierden gran parte de esa fluorescencia y se visualiza como una diagonal en el gráfico de puntos.

Las muestras de MO fueron diluidas y disgregadas con jeringuilla para incubarlas con tampón de lisis en agitación durante 20 mins. Se eliminó el tampón de lisis mediante centrifugación a 1200 rpm durante 5 mins.

Se adaptó el protocolo propuesto por William G. Telford (Telford, 2013). Se resuspendieron las células de MM a  $1.10^6$  células/ml en medio RPMI 1640 suplementado con 2% de FBS y 2 mM de ácido N-2-hidroxietilpiperacina-N'-2-etanosulfónico (HEPES) para mantener el pH estable durante el proceso. A partir de este momento se realizaron todas las manipulaciones en frío. Se precalentó la muestra en un baño a 37° C y se tomó una alícuota para realizar un control de inhibición. El control consistió en la incubación con 50 µM de reserpina (RES, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) durante 20 mins a 37° C. La RES es un inhibidor de las bombas ABC de membrana por lo que impide que el DCV pueda salir de la célula y pierda la fluorescencia. Una vez finalizado este tiempo, se dejó reservada una alícuota para realizar los controles necesarios para la citometría y se añadió al resto DCV a 5 µM, tanto a la muestra como a la alícuota con inhibidor, y se incubó a 37° C durante 90 mins. Se sacaron las muestras del baño y se

centrifugaron a 4º C y 1800 rpm durante 7 mins. Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las muestras en PEF suplementado con HEPES a 2 mM.

Se utilizó un citómetro FACSCanto™ II con un láser de 405 nm para excitar el DCV, se recogió la emisión azul con un filtro de paso de banda 450/50 y la emisión roja con un filtro dicróico de 580 nm y un filtro de paso de banda 675/20. Se añadió PI (5 µg/ml) y se detectó la población *side population* de líneas celulares de MM y de muestras de MO de pacientes con MM mediante descarte de dobletes y células no viables. Se seleccionaron las células situadas en la diagonal en el gráfico de puntos en función de la desaparición de la diagonal en la muestra que llevaba el inhibidor.

#### 4.2. Citometría de flujo y purificación de *side population*

Se realizó un fenotipo de ligandos de membrana que fuesen dianas de receptores de células NK. Todos los pasos de la citometría se realizaron en frío para ralentizar el metabolismo celular y evitar así fluctuaciones en los niveles de fluorescencia. Tras realizar el marcaje para visualizar la *side population*, se añadieron los anticuerpos (características en la tabla 6) combinados según el panel detallado en la tabla 7 manteniendo las células a una concentración constante de  $1 \cdot 10^6$  células/ml. Se incubaron a 4º C, durante 15 mins en oscuridad. Posteriormente, se lavó el exceso de anticuerpo centrifugando a 4º C, 3 mins a 1500 rpm y se resuspendió en PEF con HEPES a 2 mM.

Para cada tubo del panel, en el caso de muestras de MO, se cuantificó el porcentaje de células viables CD138<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> (CD56<sup>+</sup> o CD56<sup>-</sup> en función del paciente) que formaban parte de la *side population* y el porcentaje de células no *side population* (NSP), dentro de estas dos poblaciones se cuantificó las células que eran positivas para cada ligando estudiado en comparación con los controles FMO. En el caso de líneas celulares se cuantificó el porcentaje de células viables totales que eran *side population* y NSP y el porcentaje de ellas positivas para cada ligando.

Antígeno	Dilución	Clon	Fluorocromo	Procedencia
CD38	1:10.000	HIT2	PE/Cy7	Biolegend (San Diego, CA, Estados Unidos)
CD56	1:100	HCD56	APC/Cy7	Biolegend (San Diego, CA, Estados Unidos)
CD138	1:100	MI15	FITC	BD Pharmingen™ (San Jose, CA, Estados Unidos)
MICA/B	1:100	6D4	PE	Biolegend (San Diego, CA, Estados Unidos)
HLA A, B, C	1:100	G46-2.6	APC	BD Pharmingen™ (San Jose, CA, Estados Unidos)
MICA	1:100	#159227	PE	R&D Systems (Minneapolis, MN, Estados Unidos)
CD95 (FAS)	1:1.000	DX2	APC	Biolegend (San Diego, CA, Estados Unidos)
ULBP-1	1:100	#170818	PE	R&D Systems (Minneapolis, MN, Estados Unidos)
ULBP-2	1:100	#165903	APC	R&D Systems (Minneapolis, MN, Estados Unidos)
ULBP3	1:100	#166510	PE	R&D Systems (Minneapolis, MN, Estados Unidos)
SLAMF7	1:100	162.1	APC	Biolegend (San Diego, CA, Estados Unidos)
CD112 (Nectina-2)	1:100	TX31	PE	Biolegend (San Diego, CA, Estados Unidos)
CD117	1:100	104D2	APC	Biolegend (San Diego, CA, Estados Unidos)
CD115 (PVR)	1:200	SKIL4	PE	Biolegend (San Diego, CA, Estados Unidos)
TRAIL-R1 (DR4)	1:100	DJR1	APC	Biolegend (San Diego, CA, Estados Unidos)
TRAIL-R2 (DR5)	1:100	DJR2-4 (7-8)	PE	Biolegend (San Diego, CA, Estados Unidos)
CD56 (NCAM)	1:100	HCD56	APC/Cy7	Biolegend (San Diego, CA, Estados Unidos)
CD19	1:100	SJ25C1	PE	Biolegend (San Diego, CA, Estados Unidos)
Yoduro de propidio	5 µg/ml			Sigma Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos)

Tabla 6. Características y detalle de los anticuerpos utilizados para la citometría de células de MM.

Láser	405 nm	488 nm				633 nm	
Detector	DCV	FITC	PE	PerCP/Cy5.5	PE/Cy7	APC	APC/Cy7
<b>Tubo 1 Control Negativo</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>Tubo 2 DCV</b>	DCV	CD138	-	PI	CD38	-	CD56
<b>Tubo 3 Control de inhibición</b>	DCV + RES	CD138	-	PI	CD38	-	CD56
<b>Tubo 4 FMO PE</b>	DCV	CD138	-	PI	CD38	HLA A,B,C	CD56
<b>Tubo 5 FMO APC</b>	DCV	CD138	SLAMF7	PI	CD38	-	CD56
<b>Tubo 6</b>	DCV	CD138	MICA/B	PI	CD38	CD95/FAS	CD56
<b>Tubo 7</b>	DCV	CD138	MICA	PI	CD38	ULBP2	CD56
<b>Tubo 8</b>	DCV	CD138	ULBP1	PI	CD38	SLAMF7	CD56
<b>Tubo 9</b>	DCV	CD138	ULBP3	PI	CD38	CD117	CD56
<b>Tubo 10</b>	DCV	CD138	CD112	PI	CD38	-	CD56
<b>Tubo 11</b>	DCV	CD138	CD155	PI	CD38	-	CD56
<b>Tubo 12</b>	DCV	CD138	TRAIL DR5	PI	CD38	TRAIL DR4	CD56
<b>Tubo 13</b>	DCV	CD138	CD19	PI	CD38	CD45	CD56

Tabla 7. Panel de anticuerpos utilizados para el estudio de ligando de membrana de células de *side population* de MM.

Asimismo, se purificó la *side population* y la NSP de líneas celulares de MM (RPMI-8226, OPM-2, L-363 y JJN-3) y de muestras de MO de pacientes con MM en diferentes estadios: GMSI, MM sintomático y leucemia de células plasmáticas (LCP). Se realizó la separación con un citómetro separador FACS Aria™ III (con la configuración descrita en apartados anteriores) partiendo de un mínimo  $50 \cdot 10^6$  células/ml para las líneas celulares o de la cantidad de MO disponible para las muestras procedentes de pacientes. Las células se recogieron en medio RPMI 1640 completo con antibióticos.

#### 4.3. Construcción de librerías de ADNc y secuenciación masiva de nueva generación

Se realizó la secuenciación masiva de nueva generación (NGS) del transcriptoma completo de las células de la *side population* y de la NSP previamente purificadas de las líneas OPM-2, L-363, JJN-3 y de las muestras de MO de pacientes con GMSI, MM y LCP. Se utilizó como control un conjunto de muestras de médula ósea de 3 donantes. Se

aplicó el protocolo establecido por el fabricante. Como paso previo, se realizó una purificación y concentración del ARN antes de iniciar el proceso de secuenciación.

Como resumen general, se extrajo el ARN de cada muestra siguiendo el procedimiento ya descrito. Se realizó una depleción del ARN ribosómico (ARNr) que pudiera haber incubando el ARN aislado en un termobloque SBH130 (Stuart®, Bibby Scientific Limited, Staffordshire, Reino Unido) durante 20 mins a 37° C con 2 µl de sondas (para 5S, 5,8S, 12S, 16S, 18S y 28S), conjugadas con biotina en su extremo 5', cuya diana son regiones de secuencia altamente conservada en ARNr (Ribominus®, Ambion®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos). Posteriormente, se incubó con 140 µl de bolas magnéticas conjugadas con estreptavidina a 37° C durante 5 mins. De este modo, las bolas magnéticas se unen al ARNr con biotina. Se situaron los tubos con las muestras de ARN en un soporte magnético durante 1min a TA, el ARNr acoplado a las bolas magnéticas quedó retenido en la base del tubo. El ARN libre de ARNr se recogió del sobrenadante, se incubó durante 5 mins con 10 µl de bolas magnéticas de unión a ácidos nucleicos y etanol absoluto (el etanol favorece la unión del ARN a las bolas) y se concentró mediante sucesivos pasos de separación magnética. Finalmente, se separó de las bolas magnéticas mediante adición de agua libre de nucleasas y se recogió el sobrenadante tras incubación en el soporte magnético durante 1 min.

Se preparó el ARN para la construcción de la librería. Para ello, se fragmentó el ARN incubándolo con 1 µl de RNasa III durante 3 mins a 37° C. Se procedió a realizar la purificación del ARN fragmentado obtenido y se incubó cada muestra con 5 µl de bolas magnéticas de unión a ácidos nucleicos 5 mins en el soporte magnético del mismo modo descrito anteriormente para recuperar el sobrenadante con el ARN. Se cuantificó la concentración de ARN obtenido con el fluorímetro Qubit® 2.0 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) en modo de alta sensibilidad para ARN. La solución de trabajo contiene una sonda fluorescente que se une al ARN de manera específica, se excita la sonda fluorescente y la emisión de fluorescencia recogida es directamente proporcional a la cantidad de ARN presente. Se incubaron los estándares de concentración (0 ng/µl y 10 ng/µl) y las muestras durante 2 mins a TA con la solución de trabajo (10 µl de estándar con 190 µl de solución de trabajo, y 2 µl de muestra con 198 µl de solución de trabajo respectivamente) realizando primero la calibración del



aparato con los dos estándares de concentración y después la lectura de las muestras. Se concentraron las muestras centrifugándolas 20 mins a 30° C sin tapar.

La siguiente fase consistió en la preparación de las librerías representativas de ADNc para la secuenciación. Se hibridaron y ligaron los fragmentos de ARN fragmentado mediante el uso de adaptadores para obtener menor número de fragmentos de mayor tamaño, incubándolos con la mezcla de hibridación (5 µl por cada 3 µl de ARN) realizando un único ciclo de incubación en dos fases: 10 mins a 65° C seguido de 5 mins a 30° C. Se añadió 12 µl de la mezcla de ligación y se incubó a 30° C durante 1 hora. Para realizar la RT-PCR y obtener así el ADNc a secuenciar, se elaboraron 16 µl de mezcla de reacción que contenía: 2,5 mM de dNTPs, cebadores "*Ion RT primers*" y agua libre de nucleasas. Se añadió la mezcla al ARN hibridado y ligado, y se efectuó una preincubación a 70° C durante 10 mins en un termociclador 2720 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA, Estados Unidos). Posteriormente se añadió 4 µl de la transcriptasa inversa para efectuar la RT-PCR a 42° C durante 30 mins. Se purificó el ADNc obtenido mediante el proceso de separación magnética ya descrito.

El último paso para finalizar la librería consistió en amplificar cada muestra de ADNc añadiéndole un código identificativo (*Ion Xpress™ RNA-Seq Barcode*) y así poder, posteriormente, llevar a cabo la secuenciación de todas las muestras conjuntamente. Para ello, se utilizó *Platinum® PCR SuperMix High Fidelity* formada por: 22 U/ml de Taq DNA polimerasa recombinante, polimerasa termoestable procedente de *Pyrococcus species* GB-D y anticuerpo *Platinum® Taq*, Tris-SO<sub>4</sub> 66 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 19,8 mM, MgSO<sub>4</sub> 2,4 mM y 220 µM de dNTPs. El anticuerpo inhibe la acción de la polimerasa a TA, de modo que la amplificación sólo comienza a alta temperatura (94° C) cuando el anticuerpo es degradado, y la combinación de tres tipos de polimerasas otorga una mayor especificidad. Por otro lado, se emplearon cebadores específicos de 3' (*Ion Xpress™ RNA 3' Barcode Primer*) para la unión de los códigos identificativos en ese extremo. Para cada muestra se realizó una mezcla de 45 µl de *Platinum® PCR SuperMix High Fidelity*, 1 µl de *Ion Xpress™ RNA 3' Barcode Primer*, 1 µl de *Ion Xpress™ RNA-Seq Barcode* y 6 µl de ADNc. Se efectuó la reacción de PCR esquematizada en la figura 8. Al finalizar la PCR, se llevó a cabo una purificación mediante bolas magnéticas del nuevo ADNc amplificado que se recogió en 30 µl de agua libre de nucleasas.

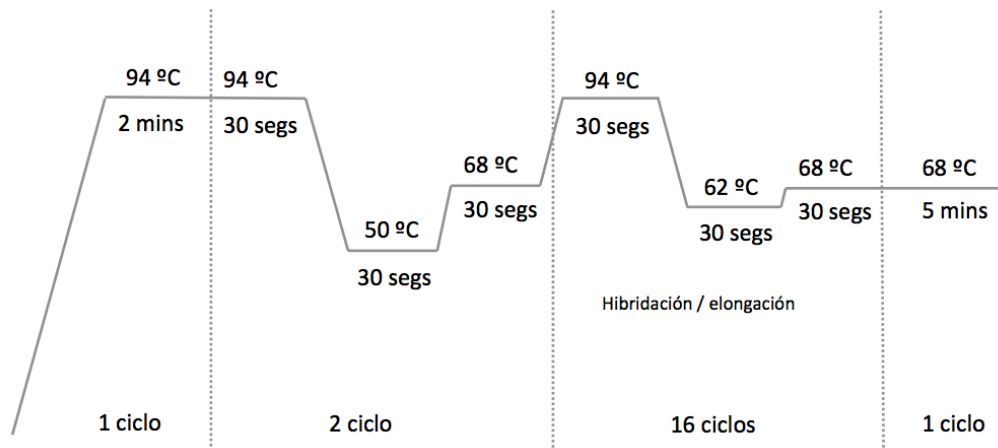


Figura 8. Esquema detallado del protocolo de PCR aplicado para la amplificación del ADNc con los códigos identificativos.

Antes de proceder a realizar la secuenciación propiamente dicha, se midió la concentración del ADNc obtenido en cada muestra con el Agilent® 2100 Bioanalyzer® (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) utilizando los reactivos de alta sensibilidad para ADN. La determinación de la cantidad de ADNc por este método se basa en la separación electroforética de los fragmentos de ADNc de cada muestra mediante el establecimiento de una corriente eléctrica sobre el chip y posterior excitación de la sonda fluorescente con un láser. Un fotodiodo detecta la emisión de fluorescencia producida. Se añadió 25 µl de la sonda fluorescente de unión a ADN al vial que contenía la matriz de gel necesaria para la migración del ADNc y se cargaron 9 µl en el chip con ayuda de la estación de carga (*Chip Priming Station*, Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania). Se pipeteó después 5 µl de los marcadores de peso molecular mínimo y máximo en los 12 pocillos del chip. Se realizó una dilución 1/10 de las muestras y se cargó 1 µl de cada una en el chip. Se pipeteó 1 µl del resto de patrones de peso molecular en el pocillo destinado a ello, 1 µl de cada una de las muestras en cada pocillo, y, por último, 1 µl de agua en los pocillos sin muestra. Se homogeneizó mediante centrifugación con vórtex y se introdujo en el analizador. Tras 45 mins el ADN ya ha

migrado lo suficiente y los datos pueden ser analizados con el programa Agilent 2100 Expert. Como resultado se obtiene un electroferograma que muestra el tamaño de los fragmentos y la intensidad de fluorescencia de cada uno de ellos, que es proporcional a la concentración de cada tipo de fragmento. Se evaluó la concentración de las librerías de ADNc y el porcentaje de ADNc por encima de 160 pbs, que debía ser mayor del 50%.

La secuenciación se realizó mediante métodos automatizados. Inicialmente, utilizando el sistema *Ion Chef™* y el kit *Ion PI™ Hi-Q™ Chef*. Para ello, se realizó un conjunto equimolecular por pares de todas las muestras a secuenciar a una concentración de 50 pM cada muestra, mediante una dilución 1/2000 - 1/4000. El sistema *Ion Chef™* lleva a cabo la carga homogénea del conjunto de muestras en el chip (*Ion PI™ Chip v3*) aislando cada fragmento de ADN en un pocillo diferente y, posteriormente, la PCR en emulsión para la amplificación clonal de cada fragmento de ADNc contenido en el conjunto. Posteriormente, se realizó la secuenciación en un secuenciador *Ion Proton™*. Este tipo de secuenciación se basa en la detección de cambios de pH debidos a la liberación de un protón al medio cuando el dNTP es incorporado. Se expone la hebra de ADN molde de cada pocillo del chip a la polimerasa y a cada uno de los dNTPs no modificados de manera individual y secuencial, si el dNTP es incorporado se libera un protón y se detecta el cambio de pH, si no es incorporado, no hay cambio de pH. Se lava la muestra para eliminar los restos del dNTP anterior y se procede a exponerla al siguiente dNTP y así sucesivamente.

Se monitorizó la evolución del proceso de secuenciación con el soporte informático *Torrent Suite™ v4.4.2*, servidor a través del cual también se descargaron los datos obtenidos. Como librería de referencia se utilizó hg19 (*homo sapiens*).

Finalmente, se procesaron los resultados con el programa informático *Partek® Flow®* (*Partek®, Misuri, Estados Unidos*). Para ello, el programa eliminó las lecturas correspondientes a adaptadores y a bases aisladas al final de las lecturas. Se realizó una primera fase de alineamiento de las lecturas obtenidas en base a un genoma de referencia (*Homo sapiens-hg38*) combinando los algoritmos de alineamiento *Star 2.3.1j* y *Bowtie 2.2.1.0*. Para los fragmentos no alineados en la primera fase se empleó una segunda combinación de los algoritmos *TopHat 2* y *Bowtie 2.2.1.0*, y se realizaron

controles de calidad de las lecturas obtenidas pre-alineamiento y post-alineamiento. Se realizó un análisis de enriquecimiento basado en *Gene Ontology Consortium* para agrupar los genes sobre o infraexpresados según su función celular, los procesos biológicos en los que se encuentran implicados y el componente celular en el que actúan (Ashburner et al., 2000, Gene Ontology, 2015).



## 5. ENSAYO CLÍNICO NK-VS-MM

La evaluación clínica de las NKAЕ se realizó a través del ensayo clínico de fase I: “Ensayo clínico de fase I para evaluar la seguridad y la dosis de células NK autólogas activadas y expandidas en la consolidación del tratamiento de los enfermos con mieloma múltiple en segunda o más recaída”. Este ensayo ha sido registrado en el registro europeo de ensayos clínicos EudraCT-R con el número de registro 2012-000514-11, y en la base de datos de ensayos clínicos americana clinicaltrials.gov con número de registro NCT02481934.

### 5.1. Diseño del estudio y criterios de inclusión

El estudio consistía en un ensayo clínico terapéutico exploratorio, abierto, de un solo brazo, no aleatorizado, en el que se podía incluir un máximo de 10 pacientes. Los pacientes debían cumplir los criterios de inclusión descritos en la tabla 8.

Se incluyeron 5 pacientes a lo largo de 24 meses. Los pacientes reclutados debían haber recibido un mínimo de 4 ciclos de tratamiento de rescate previo y haber demostrado quimiosensibilidad. Los pacientes incluidos tenían que haber obtenido enfermedad estable o respuesta parcial estable (de al menos 2 ciclos de estabilidad) una vez cumplido el 75% del tratamiento de rescate proyectado o encontrarse en situación de progresión subclínica (definida por un incremento del componente monoclonal  $\geq$  25%) en cualquier momento del tratamiento de rescate. La tolerancia al tratamiento de rescate habrá debido ser aceptable, sin efectos adversos G3/4, y de existir efectos adversos G1/2, estos debían ser objetivados inmediatamente antes del inicio del programa de reinfusión.

Criterio de inclusión	Valor
Edad	> 18 años
Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG)	≤ 2
Recuento Absoluto de Neutrófilos (RAN)	> 1000/μl
Plaquetas	> 50000/μl
Hemoglobina	> 8.0 g/dl
Creatinina sérica	< 2.0 mg/dl
Aclaramiento de creatinina	> 30 ml/min
Transaminasas séricas	< 2.5 veces el límite superior de la normalidad
Bilirrubina	< 1.5 veces el límite superior de la normalidad
Espectativa de vida	> 6 meses
Firma de consentimiento informado	
Criterio de exclusión	
Ausencia de respuesta al tratamiento de rescate / progresión clínica	
Pacientes que hayan alcanzado remisión completa	
Infección no controlada	
Otra enfermedad maligna activa	
Necesidad inmediata de quimioterapia	
Hepatitis B/C activa	
Historia previa de infección por VIH	
Embarazo o lactancia	

Tabla 8. Criterios de inclusión y selección de los pacientes.

La variable principal de estudio fue la seguridad en términos de toxicidad clínica medida según criterios de toxicidad del *National Cancer Institute* utilizando los criterios de terminología común para eventos adversos (*Common Terminology Criteria for Adverse Events CTCAE v4.0*). Se estudió la eficacia de la infusión de las células NKA-E como variable secundaria en términos de incremento de respuesta según reducción de componente monoclonal o mejora de la calidad de la respuesta según criterios de la IMWG.

## 5.2. Pacientes

Se incluyeron en el ensayo clínico 5 pacientes con mieloma múltiple refractario en recaída (entre 2 y 7 líneas previas de tratamiento) que cumplieran todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión. Las características de cada paciente han sido detalladas en la tabla 9. Tres de los pacientes se encontraban en progresión asintomática (PA) y dos de ellos en respuesta parcial (RP) tras recibir tratamiento de rescate previo a la inclusión en el ensayo clínico.

Paciente	Edad	Sexo	Citogenética por FISH en células CD138+	Recaída previa (n)	TASPE previo (n)	Tratamiento previo con LEN o BOR (Si/No)	Tiempo desde diagnóstico (años)	Tratamiento concomitante con NKA-E	Situación de la enfermedad
01	53	M	Amplificación 1q	5	2	Sí	7	Len	Progresión asintomática
02	61	F	Deleción 14q	2	1	Sí	2	Len	Progresión asintomática
03	73	F	Amplificación 1q Deleción 17p	4	0	Sí	5	Bor+Ben	Respuesta parcial
04	62	M	Amplificación 1q Deleción 17q	6	2	Sí	10	Bor+Ben	Respuesta parcial
05	72	F	Deleción 17p Deleción 1q	7	2	Sí	13	Len	Progresión asintomática

Tabla 9. Características de los pacientes incluidos en el ensayo clínico EudraCT 2012-000514-11.



### 5.3. Protocolo y esquema de tratamiento

Los pacientes recibieron tratamiento quimioterapéutico de manera concomitante a la administración de las células NKAE. El tratamiento de elección fue el tratamiento de rescate recibido previamente al inicio de este ensayo clínico, de modo que la única modificación del tratamiento antitumoral fuese la adición de las células NKAE.

Dado que los corticoides poseen un efecto inmunosupresor, previamente a la primera infusión de células NKAE se realizó un periodo de lavado de dos semanas en las que se suspendió la administración de dexametasona. No se administró ningún tipo de corticoide durante toda la duración del tratamiento con NKAEs.

El esquema de tratamiento consistió en cuatro ciclos de tratamiento quimioterapéutico (LEN oral 10/25 mg al día durante 21 días cada ciclo o BOR subcutáneo 1,3 mg/m<sup>2</sup> al día en los días 1, 4, 8 y 11 de cada ciclo) y dos infusiones de 7,5.10<sup>6</sup> NKAEs/kg de peso (figura 9).

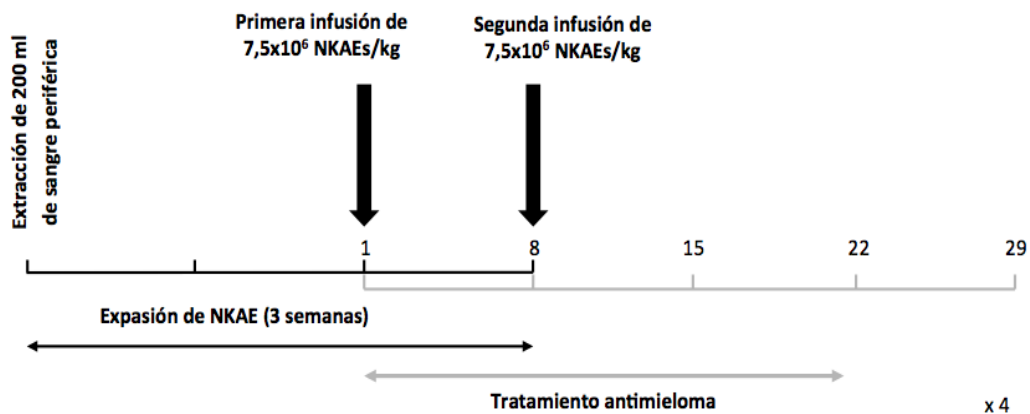


Figura 9. Esquema de tratamiento y línea temporal (en días).

Para ello, dos semanas antes del inicio de cada ciclo, se extrajeron 200 ml de SP mediante punción venosa para realizar la expansión *ex vivo* de NKAEs. La SP fue recogida en bolsas de transferencia con 15 UI/ml de heparina sódica como antiagregante. La SP se envió a la sala blanca del Hospital Universitario Niño Jesús (HNJ) mediante mensajería especializada a una temperatura estable entre 18 y 25°C durante un tiempo no superior a 2 horas. Una vez allí, se procedió a activar y expandir en cultivo las NKAEs (volver al punto 3.2. para ver el detalle del proceso de producción de células NKAe) en condiciones de buenas prácticas de manufacturación (*good manufacturing practices*: GMP) durante 21 días.

En los días 14 y 21 de expansión, coincidiendo con los días 1 y 8 de ciclo quimioterapéutico, las células NKAe fueron recogidas, lavadas y resuspendidas en suero fisiológico a una concentración variable en función de la cantidad requerida según el peso del paciente, en un volumen entre 50 y 100 ml. El producto final de la expansión debía respetar los estándares de viabilidad y pureza establecidos (> 70% de viabilidad y > 75% de pureza en NKAe), asimismo debía superar las pruebas de esterilidad, realizadas mediante inoculación directa, tinción de Gram y ensayos de micoplasma. En el H12O se realizaron también estudios de tumorigenicidad, mediante cuantificación de la expresión de Tert y cMyc por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, y cariotipo de los 3 primeros pacientes incluidos.

Los productos finales fueron enviados desde la sala blanca del HNJ al H12O en las condiciones mencionadas anteriormente para su infusión.

Previamente a cada infusión de células NKAe en los días 1 y 8, los pacientes recibieron tratamiento profiláctico con 650-1000 mg de paracetamol vía oral, 5 mg de dexclorfeniramina y 50 mg de ranitidina intravenosos. La infusión se realizó a una velocidad inicial de 0,5 ml/min durante los primeros 30 mins, entre 0,5 y 1 ml/min los siguientes 30 mins, y a 1,5 ml/min a partir del minuto 61 de infusión. Al acabar la infusión los pacientes permanecieron 2 horas en observación.

Posteriormente, los pacientes acudían el día 15 de cada ciclo para la extracción de 200 ml de SP para la expansión de NKAEs del ciclo siguiente.

#### 5.4. Monitorización de la enfermedad

Para evaluar tanto la toxicidad como la eficacia de las células NKAЕ los pacientes acudían a consulta de manera periódica en los días 1, 3, 8, y 15 del primer ciclo (días 1 y 8 antes de la infusión, ciclos de 28 días de duración) y en los días 1, 8 y 15 de los 3 ciclos posteriores. Los pacientes se realizaron analíticas que incluían bioquímica general y hematimetría. En los días 1 y 8 de cada ciclo se realizó también estudio de proteínas en suero y en orina. Se realizó un seguimiento mensual de la evolución de la enfermedad tras la finalización del tratamiento con NKAЕ durante 6 meses, y trimestral durante otros 6 meses hasta completar un año. Toda la información relativa al protocolo y procedimientos del ensayo clínico puede ser consultada en el anexo II.

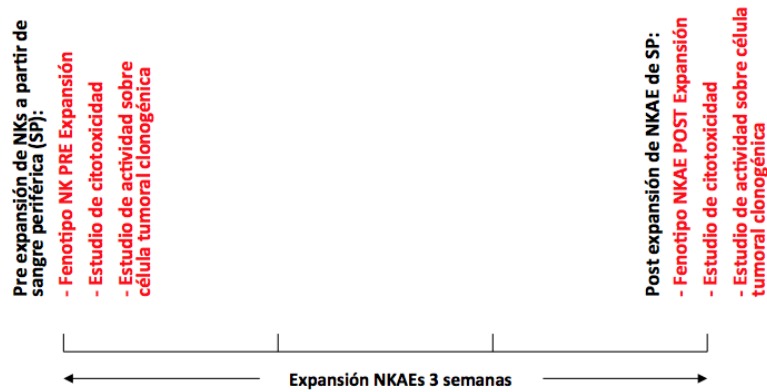
La eficacia se evaluó mediante seguimiento de los valores de proteína monoclonal en suero, salvo en la paciente 03 en la que se evaluó mediante seguimiento de la ratio de cadenas ligeras kappa ( $\kappa$ )/lambda ( $\lambda$ ).

#### 5.5. Estudios biológicos asociados

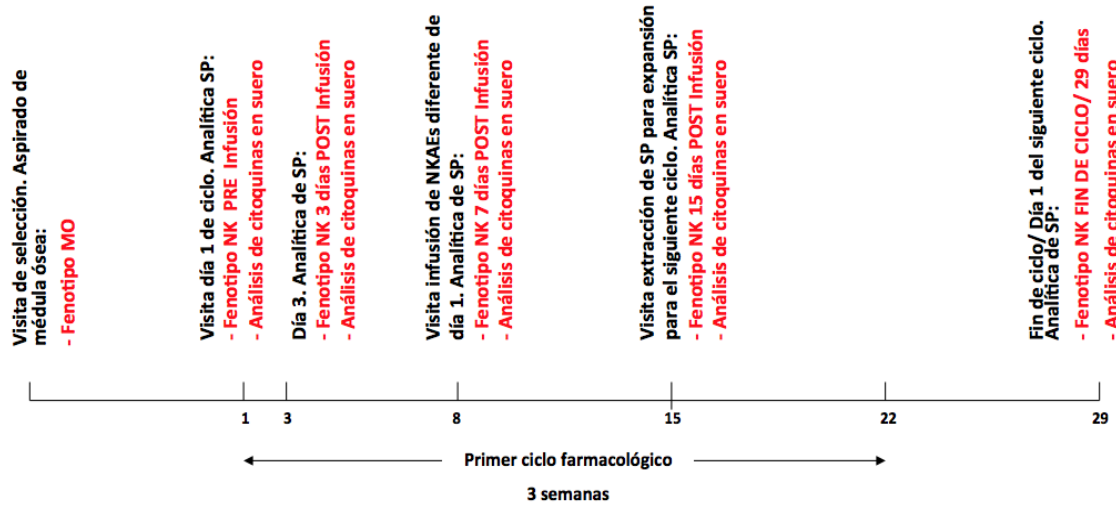
Los mismos estudios biológicos realizados con el resto de muestras se realizaron con las muestras de los pacientes incluidos en el ensayo clínico. Se tomaron 16-18 ml de SP de los pacientes previamente al inicio del ensayo para expandir y activar sus NKs tal y como se ha descrito en el punto 3.2. Tanto al inicio como al final de la expansión se realizaron los estudios funcionales anteriormente descritos, así como inmunofenotipo por CMF, tal y como se indica en la figura 10.

Durante el primer ciclo de tratamiento con NKAЕs se caracterizó el perfil de expresión de receptores de membrana de NKs mediante inmunofenotipo por CMF de las NKs de SP de los pacientes en los días 1, 3, 8, y 15 del primer ciclo, en los días 1 y 8 de los 3 ciclos posteriores, y el último día del cuarto ciclo siguiendo la metodología anteriormente descrita. Asimismo, se caracterizó también el perfil de expresión de citoquinas en suero durante el primer ciclo.

### Expansión de NKAEs



### Primer ciclo



### Segundo ciclo y posteriores

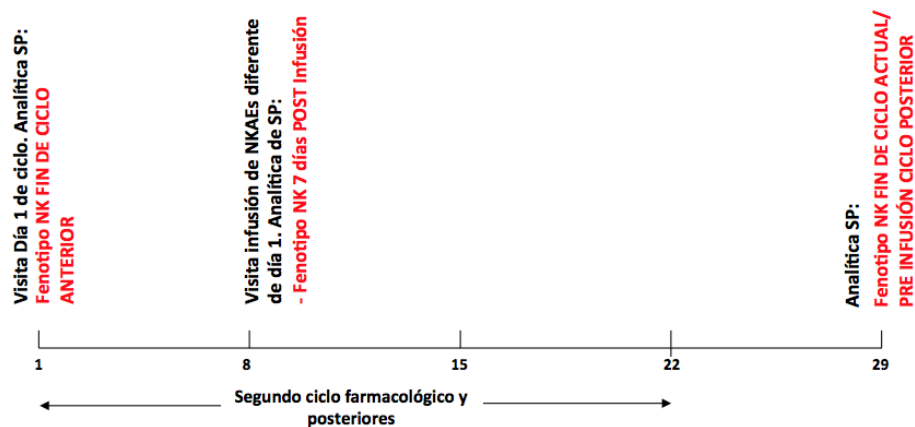


Figura 10. Esquema representativo de los estudios biológicos realizados en células NKAE de los pacientes incluidos en el ensayo clínico y en células NK de SP de los pacientes durante el ensayo clínico.

### 5.5.1. Análisis de citoquinas en suero

Se obtuvo el suero tras centrifugar, en tubo de polipropileno, muestras de SP de los pacientes a 4<sup>º</sup> C durante 7 mins a 4500 rpm. Las citoquinas cuyos niveles se cuantificaron fueron la interleuquina-2, la interleuquina-4, la interleuquina-6, la interleuquina-10 (IL-10), el factor de necrosis tumoral, el interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y la interleuquina-17A (IL-17A). Se cuantificó la concentración de citoquinas presentes en suero en los días 1 (antes de la infusión), 3, 8 y 29 del primer ciclo (o día 1 del siguiente ciclo antes de la primera infusión). Para ello se utilizó el BD CBA Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (BD™ Cytometric Bead Array, Becton Dickinson and Company BD Biosciences, San Jose, CA, Estados Unidos) y se realizó el protocolo siguiendo las instrucciones definidas por el fabricante. La tecnología CBA se basa en la mezcla de unas bolas de tamaño y fluorescencia conocidos. Cada tipo de bola se conjuga con un anticuerpo específico para cada una de las 7 citoquinas solubles de interés. En función de la cantidad de analito soluble que se une al tándem anticuerpo-bola, tras añadir el agente detector consistente en una mezcla de anticuerpos acoplados a PE, se obtendrá una señal fluorescente determinada. Mediante CMF se puede detectar la señal fluorescente emitida por cada uno de los siete tipos de bola y compararla con la de una curva patrón formada por muestras de concentración conocida (pg/ml).

Se prepararon los estándares de concentración, formados por citoquinas recombinantes liofilizadas, reconstituyéndolos en 2 ml de diluyente 1X (compuesto por un tampón con suplemento proteico). Se dejó reposar 15 mins a temperatura ambiente y se resuspendió varias veces mediante el uso de una pipeta. A partir de esta solución *stock* se realizaron 8 diluciones seriadas desde una ratio 1:2 hasta 1:256. Se procedió a realizar la mezcla de los 7 tipos de bolas diferentes (uno por cada citoquina a detectar), se tomaron 10  $\mu$ l de cada una por cada tubo de muestra a estudiar (X muestras problema de suero, 9 muestras estándar y 1 control negativo) y se reemplazó el medio en el que se encontraban por el mismo volumen de diluyente. Una vez realizada la mezcla se dispensó 50  $\mu$ l de la misma en cada tubo con 50  $\mu$ l de muestra y 50  $\mu$ l del agente detector (anticuerpo-PE) y se incubó 3 horas a TA y en oscuridad. Se lavaron las muestras con tampón de lavado (PBS 1X suplementado con proteínas y detergente) durante 5 mins a 1200 rpm, y se resuspendieron en 200  $\mu$ l del mismo tampón.

Se adquirieron las muestras en un citómetro FACSCanto™ II utilizando la plantilla proporcionada por el fabricante. Se ajustaron los voltajes con el control de bolas para la configuración del experimento incluido en el kit, hasta situar la población en la zona indicada según FSC y SSC y alcanzar los valores diana de intensidad media de fluorescencia (MFI) determinados por el fabricante para FITC, PE y APC. Los archivos fcs resultantes se analizaron con el programa informático CFAP Array v3.0 (BD Biosciences, San Jose, CA, Estados Unidos) para obtener el valor de concentración en cada muestra problema para cada citoquina.

### 5.5.2. Análisis de linfocitos T reguladores

Mediante citometría de flujo (con un citómetro FACSCanto™ II y como soporte informático FACSDiva v8) se analizó la presencia de linfocitos T reguladores (Treg) en las muestras de SP de los pacientes en diferentes momentos del ensayo clínico. Con este estudio se pretendió determinar si se producían mecanismos compensatorios de regulación negativa en respuesta a la infusión de células NKAE. Para ello, se determinó qué porcentaje de linfocitos T CD3<sup>+</sup> eran también CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>. Las características de los anticuerpos empleados se detallan en la tabla 10.

Antígeno	Dilución	Clon	Fluorocromo	Procedencia
CD3	1:100	UCHT1	PE/Cy7	Biolegend
CD4	1:100	RPA-T4	APC/Cy7	Biolegend
CD25	1:100	BC96	FITC	Biolegend
CD56 (NCAM)	1:100	HCD56	APC	Biolegend
CD127 (IL-7Rα)	1:100	A019D5	PE	Biolegend
Yoduro de propidio	5 µg/ml			Sigma Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos)

Tabla 10. Características de los anticuerpos empleados para la detección de linfocitos Treg.

### 5.5.3. Extensiones de SP

Se realizaron frotis de SP de los pacientes antes de la infusión, inmediatamente después de la infusión, una hora post-infusión y 24 horas post-infusión. Como método de discriminación de los diferentes tipos celulares presentes en la muestra se usó la tinción con eosina Y y azul de metileno (también denominado azul B) de Romanowsky según Wright. Esta solución está compuesta por metanol como disolvente y agente fijador de las células, y eosina Y y azul de metileno como colorantes. Estos colorantes se unen de forma no covalente a las estructuras celulares, siendo la eosina un colorante ácido con afinidad por las estructuras básicas mientras que el azul de metileno es un colorante básico con afinidad por los componentes celulares ácidos. En función de la proporción de estos compuestos que se una a las estructuras celulares, se obtendrán diferentes tonalidades de coloración. Así, la eosina será captada en mayor medida por gránulos eosinófilos, la hemoglobina de los eritrocitos, y otras proteínas, otorgándoles una coloración roja o rosada. En cambio, el azul de metileno se unirá al ADN, ARN y gránulos basófilos. De este modo el núcleo se teñirá de color azul/violeta intenso y el citoplasma de color azul claro.

Se depositó una gota de SP sobre un portaobjetos (Biosigma, Venecia, Italia). Con la ayuda de otro portaobjetos se extendió la muestra y se dejó secar al aire. Se colocó el portaobjetos en una gradilla para tinción y se cubrió por completo con 2 ml de tinción de Wright (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania). Se incubó 4 mins a temperatura ambiente. Posteriormente, se eliminó por decantación y se incubó durante 9 mins con la solución de Wright diluida al 60 % con agua corriente. Finalmente, se eliminó por decantación el colorante y se lavó rápidamente con agua corriente para dejarlo secar al aire.

Se observaron las preparaciones con un microscopio Nikon Eclipse 80i (Nikon, Tokio, Japón) equipado con una cámara Nikon Digital Sight DS-Fi1, un objetivo PLAN 100XA/ NA 1.25 Oil  $\infty$ /0.17 WD 0.2 y un objetivo PLAN 20X/NA 0.40  $\infty$ /0.17 WD 1.2. Como soporte informático se utilizó la unidad de control DS-L2 (Nikon, Tokio, Japón). Se realizó un recuento de 100 células a una magnificación de 100X tomando diferentes campos de la preparación aleatoriamente.

## 6. MATERIALES

El medio de cultivo estéril RPMI 1640 con glutamina estable (a una concentración de 2 mM) así como el HEPES fueron adquiridos en Biowest (Biowest SAS, Nuaillé, Francia). El FBS de origen sudamericano Hyclone así como el medio de centrifugación por densidad Ficoll-Paque™ PLUS fueron comprados en GE Healthcare (General Electric Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). El material de plástico estéril utilizado, como los tubos Falcon®, los frascos de cultivo o las placas multipocillo, fue adquirido en Corning (Corning Incorporated, Berlin, Alemania) salvo que se especifique lo contrario. Los tubos para extracción de sangre periférica por sistema de vacío con K<sub>2</sub>EDTA de 9 ml y con heparina-litio de 4 ml para la recogida de SP y de MO proceden de Vacutest (Vacutest Kima, s.r.l., Arzergrande, Italia). Todos los reactivos utilizados para la extracción de ARN procedían de Qiagen (Hilden, Alemania) y todos los ensayos Taqman así como las mezclas de reacción Taqman para la realización de PCR cuantitativa procedían de Applied Biosystems (Carlsbad, CA, Estados Unidos) salvo que se especifique lo contrario. Todos los reactivos utilizados para los diferentes pasos de secuenciación masiva proceden de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, Estados Unidos) salvo que se indique lo contrario.

## 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar (DE). Los datos de las expansiones de células NK y de citometría de flujo se expresaron como la mediana  $\pm$  rango intercuartil (IQR) para evitar una mayor influencia de los valores extremos. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa informático SPSS v.23 (IBM, Armonk, Nueva York, Estados Unidos) mediante la prueba de la t student, en el caso de variables dicotómicas, o el análisis de la varianza (ANOVA) para variables de más de dos categorías. Para variables que no siguiesen una distribución normal, se aplicaron pruebas no paramétricas como la U de Mann Whitney o el test de Kruskal-Wallis respectivamente. La prueba de la t Student pareada o la prueba de Wilcoxon con signo se utilizaron para variables dependientes. Se consideró estadísticamente significativo un valor de p inferior a 0,05 a partir de un número n de experimentos siempre igual o



superior a 3 (el número de experimentos en cada caso se especifica en el texto). Las gráficas representativas se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA, Estados Unidos). Para los datos obtenidos por secuenciación masiva se cuantificó la abundancia de cada transcrito empleando el algoritmo de Partek® E/M (optimización de Partek® del algoritmo Esperanza-Maximización). Se analizó la expresión diferencial de cada transcrito mediante el algoritmo GSA (*Gene Specific Analysis*). Se tomó como estadísticamente significativo un valor de FDR (*false discovery rate*) inferior a 0,05.

## 8. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Todos los procedimientos relativos a este estudio se han realizado siguiendo los principios dictados por la Declaración de Helsinki. Todos los sujetos implicados en el ensayo clínico, así como todos aquellos de los que se han obtenido muestras, firmaron el consentimiento informado correspondiente aprobado por el comité ético de investigación clínica del Hospital Universitario 12 de Octubre, previo a la entrada al ensayo clínico o a la obtención de la muestra. Todos los procedimientos relacionados con el ensayo clínico se realizaron siguiendo las normas de buenas prácticas clínicas (GCP) por todo el personal implicado en el estudio. De igual modo, todos los procedimientos de producción de las células NKAE para su infusión se realizaron siguiendo buenas prácticas de manufacturación en todo momento.

Asimismo, los datos de los sujetos implicados han sido tratados de acuerdo a la legislación vigente (Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal).

// Resultados



## 1. LAS CÉLULAS NK PUEDEN ACTIVARSE, EXPANDIRSE Y DESTRUIR LAS CÉLULAS DE MM

### 1.1. Actividad citotóxica de células NK sobre células de MM y sobre la célula tumoral clonogénica de MM

Se expusieron células de MM de líneas celulares en suspensión a células NK obtenidas de SP tal y como se ha descrito anteriormente. Se evaluó la actividad citotóxica de estas células NK a diferentes ratios NK:MM (32:1, 16:1, 8:1, 4:1 y 2:1) manteniendo una concentración constante de células diana L-363, OPM-2 o U-266. Se comparó la actividad citotóxica tanto de NKs procedentes de pacientes como de donantes mediante cuantificación del porcentaje de células de MM lisadas por las NKs. Las células NK de donantes mostraron actividad frente a las tres líneas de MM, aunque la capacidad de lisis fue variable en función de la línea (figura 11). Se observó un porcentaje máximo de lisis de células de MM a una ratio de 32:1 frente a todas las líneas: 50,12%±16,06%, 38,49%±14,51% y 34,94%±28,62% para L-363, OPM-2 y U-266 respectivamente (figura 11 A-C). A ratios inferiores, se apreció una disminución de la citotoxicidad de manera dependiente de la concentración en todos los casos pese a que a 16:1 y 8:1 se objetivó una pequeña pérdida de linealidad en el caso de donantes únicamente para la línea celular U-266, que en el caso de pacientes se produjo a ratios inferiores 8:1-4:1 para L-363 y OPM-2. Las células NK de pacientes mostraron una capacidad de destrucción inferior a la de donantes, pero sin diferencias significativas salvo a ratios 16:1 ( $p=0,042$ ) y 8:1 ( $p=0,011$ ) para L-363 y 16:1 ( $p=0,007$ ) para OPM-2. La máxima lisis se produjo a una ratio de 32:1 frente a las tres líneas celulares: 28,7%±16,53%, 28,2%±21,76% y 36,66%±21,51% para L-363, OPM-2 y U-266 respectivamente (figura 11 A-C). La máxima diferencia de citotoxicidad observada entre pacientes y donantes se produjo a una ratio de 32:1 frente a la línea L-363 y correspondió a una diferencia de 21,42%, siendo las NK de donantes más citotóxicas que las de pacientes. No se observó ningún patrón de actividad en función de la línea de MM utilizada ya que en el caso de las NK de donantes la citotoxicidad máxima se produjo frente a L-363 y, en cambio, en el caso de NK de pacientes frente a U-266.

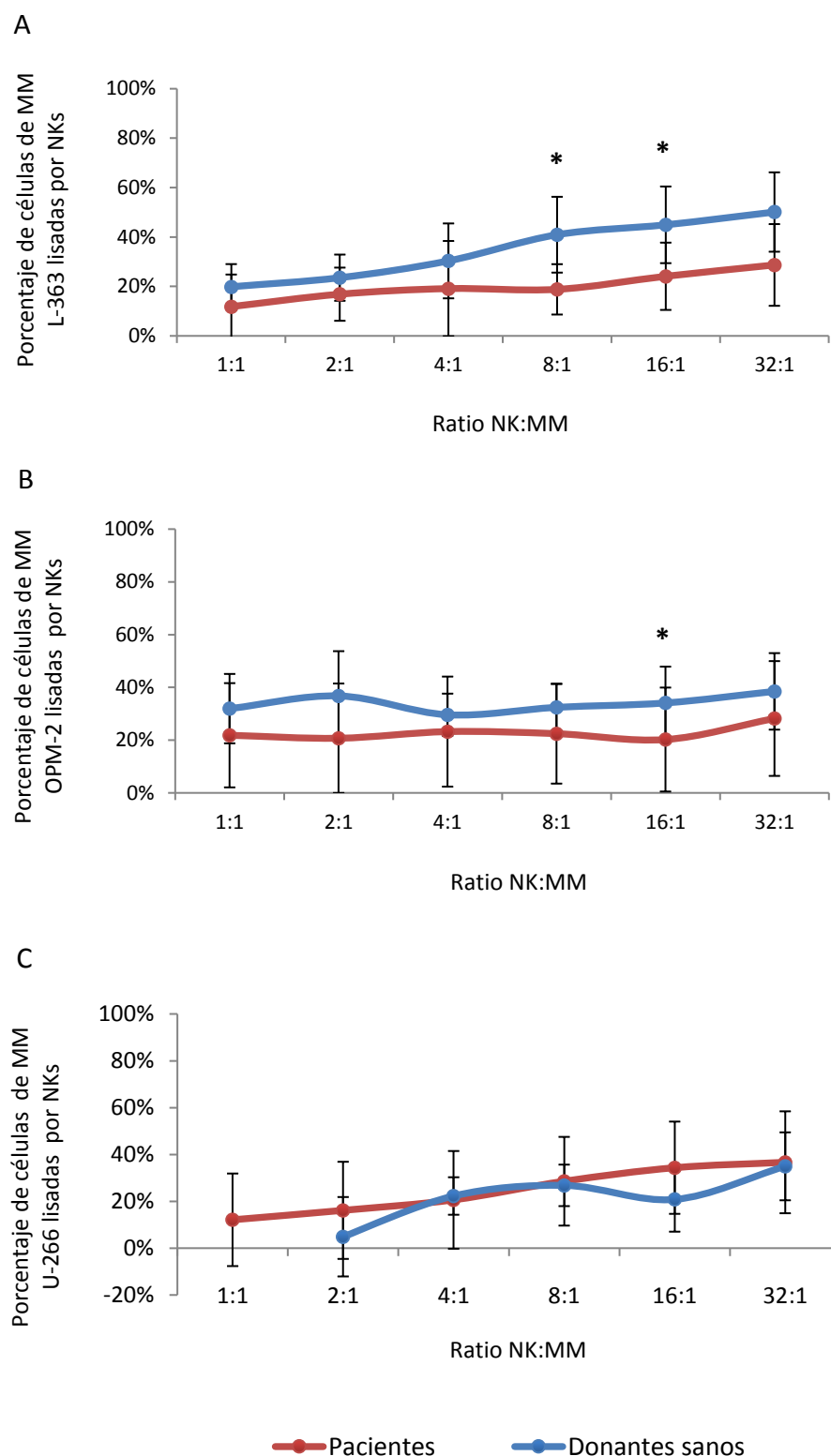


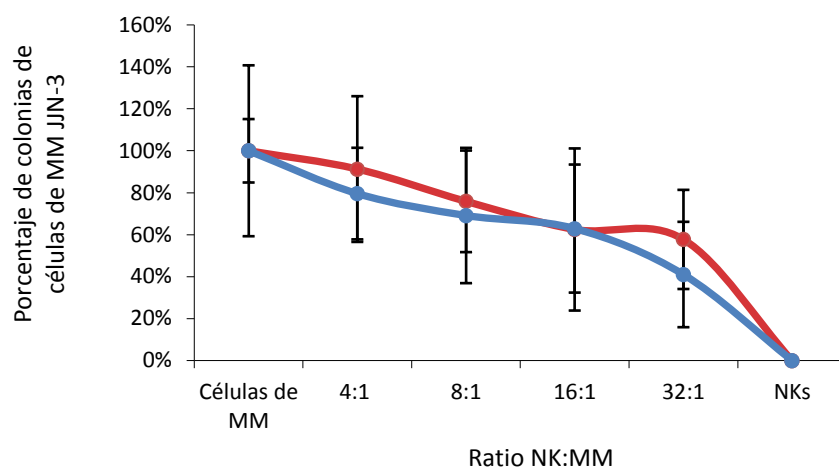
Figura 11. **Las células NK de pacientes y de donantes destruyen las células de MM en suspensión.** Se evaluó la actividad citotóxica de células NK de donantes y de pacientes frente a tres líneas celulares de MM: L-363 (A), OPM-2 (B) y U-266 (C). Los resultados representan la media  $\pm$  DE de un mínimo de 5 experimentos independientes para cada línea celular de MM y cada ratio, y se expresan como el porcentaje de células de MM lisadas por las células NK. \*  $p < 0,05$  respecto a donantes para una misma ratio.

Por otro lado, se estudió la actividad citotóxica de células NK sobre la célula tumoral clonogénica de MM en cultivos semi-sólidos de metilcelulosa. Se utilizó las mismas ratios NK:MM que para los estudios de citotoxicidad frente a células en suspensión salvo 2:1 y 1:1 ya que se apreció una pérdida de la linealidad a concentraciones tan bajas (datos no mostrados). Se expuso las células de MM (de las líneas JJN-3, NCI-H929, L-363, OPM-2 y RPMI-8226) a células NK, tanto de pacientes como de donantes, durante 2 horas tras lo cual se dejaron en cultivo 14 días y se realizó un recuento de colonias visibles a simple vista. Tras el cultivo se observó que las células NK de pacientes poseían capacidad de destrucción de la célula tumoral clonogénica de MM, pero ésta era inferior a la de donantes frente a cualquiera de las líneas estudiadas. Al igual que en los experimentos de citotoxicidad en suspensión, se apreció que la actividad de las células NK tanto de donantes como de pacientes es variable según la línea de MM a la que se enfrenten. Tanto para células NK procedentes de donantes como para las procedentes de pacientes se apreció que la actividad máxima se produjo a una ratio de 32:1 para las líneas JJN-3, NCI-H929, OPM-2 y RPMI-8226. A ratios inferiores se observó una disminución de la citotoxicidad de manera dependiente de la concentración. Se observó una actividad citotóxica máxima frente a la célula tumoral clonogénica de la línea NCI-H929 llegando a destruir en el caso de NKs de donantes un  $99,81\pm0,09\%$  de células clonogénicas a una ratio máxima de 32:1, y en el caso de pacientes  $89,84\pm10,10\%$  a misma ratio (figura 12 C). No obstante, este resultado no se reproduce en el resto de líneas, en las cuales la destrucción de células clonogénicas fue menos drástica sobre todo en pacientes: las NKs de donantes destruyeron un  $59\pm25,11\%$ , un  $62,32\pm18,99\%$  y un  $87,51\pm6,52\%$  de células clonogénicas de JJN-3, OPM-2 y RPMI-8226 respectivamente, y en el caso de NKs de pacientes un  $42,27\pm23,63\%$ , un  $60,51\pm29,23\%$  y un  $60,75\pm23\%$  para JJN-3, OPM-2 y RPMI-8226 respectivamente (figura 12 A, D y E y figura 13). Inclusive, no se apreció ninguna influencia de la concentración de células NK utilizada sobre la línea L-363 (figura 12 B), sobre la cual la actividad de las células NK fue la mínima detectada ( $29,94\pm19,26\%$  en el caso de donantes y  $15,71\pm14,35\%$  en el caso de pacientes).

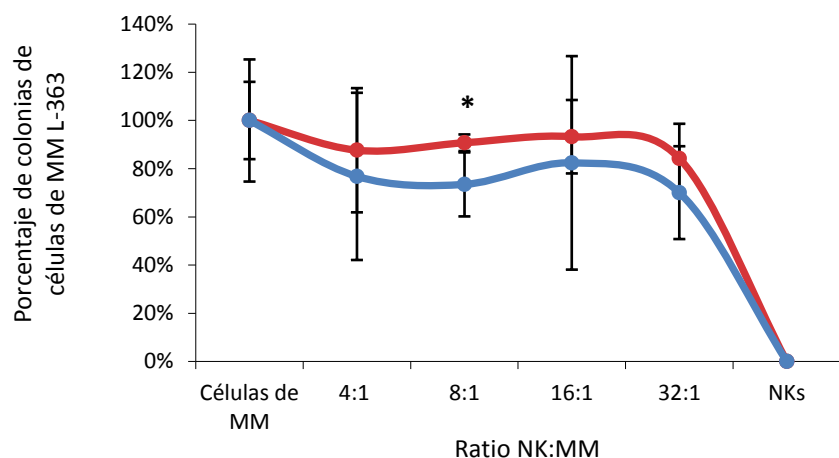
Se observaron diferencias significativas ( $p<0,05$ ) para las ratios 16:1 y 8:1 en los casos de NKs procedentes de donantes frente a RPMI-8226 y NCI-H929. De hecho, para

la línea NCI-H929 se observaron diferencias significativas en el crecimiento de células de MM para todas las ratios utilizadas tanto en el caso de NKs de donantes como en las de pacientes.

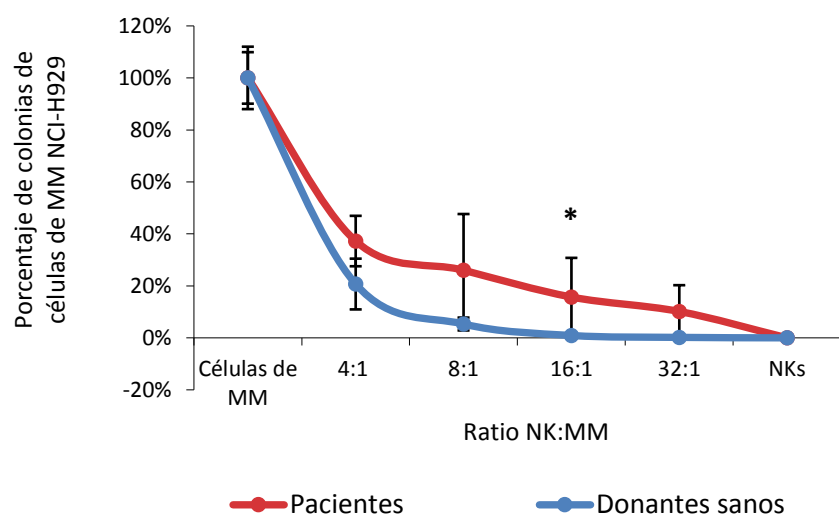
A



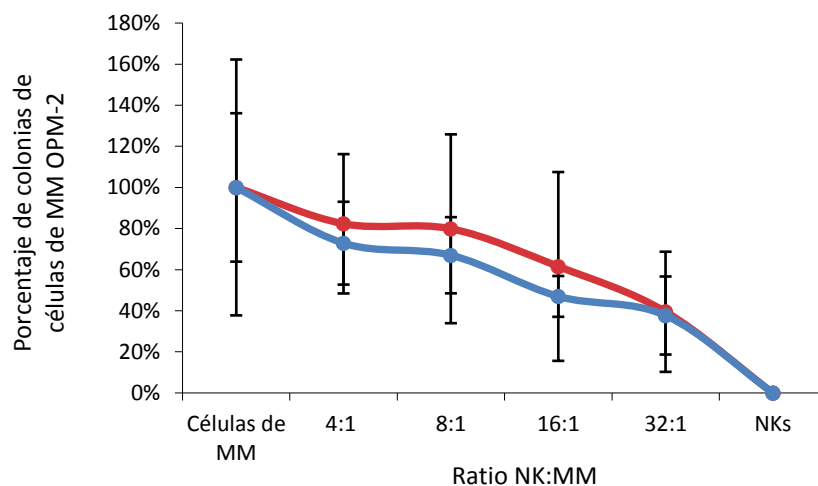
B



C



D



E

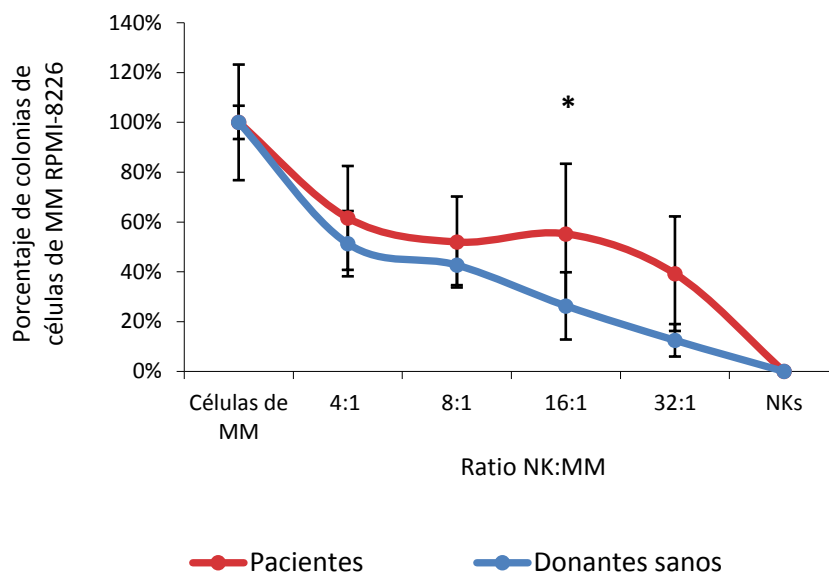


Figura 12. **Las células NK de pacientes destruyen la célula tumoral clonogénica de MM de manera menos eficaz que las células NK de donantes.** Se analizó la actividad citotóxica de células NK de donantes y de pacientes en medio semi-sólido frente a cinco líneas celulares de MM: JJN-3 (A), L-363 (B), NCI-H929 (C), OPM-2 (D) y RPMI-8226 (E). Los resultados representan la media  $\pm$  DE de un mínimo de 5 experimentos independientes para cada línea celular de MM y cada ratio, y se expresan como el porcentaje de colonias de MM crecidas tras 14 días de cultivo previa exposición a NKs, en función del porcentaje de crecimiento de colonias de MM (que no han sido expuestas a NKs). \*  $p < 0,05$  para NKs de donantes frente a NKs de paciente para una misma ratio.



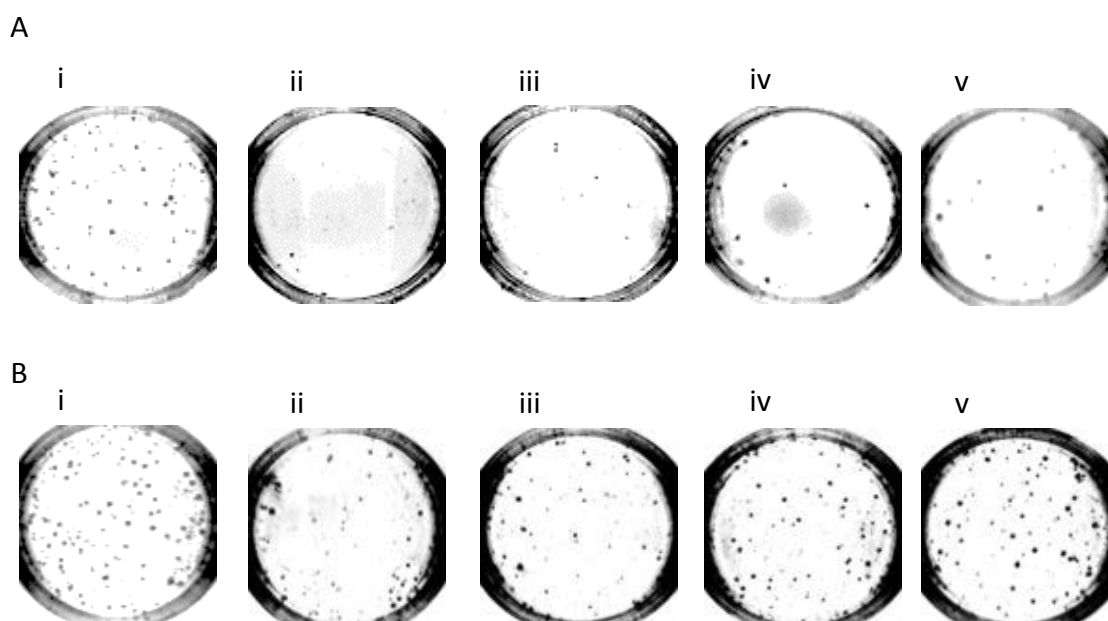


Figura 13. **Cultivos de células clonogénicas de líneas de MM en metilcelulosa.** Imágenes representativas de los cultivos de metilcelulosa realizados previa exposición de las células de MM a células NK y observación de las colonias tras 14 días de cultivo. Las imágenes muestran las colonias de la línea celular de MM RPMI-8226 tras exposición a células NK procedentes de donantes **(A)** y a células NK procedentes de pacientes con MM **(B)**. De izquierda a derecha se muestra: **(i)** colonias de células de MM no enfrentadas a células NK, **(ii)** colonias de células de MM previamente expuestas a células NK a una ratio 32:1, **(iii)** 16:1, **(iv)** 8:1 y **(v)** 4:1.

Se comparó la actividad de las células NK frente a células de MM en suspensión (células de MM totales sin distinción) y en medio semisólido (para ver el efecto sobre las células clonogénicas) de las líneas L-363 y OPM-2. Se consideró que la línea celular L-363 era resistente a la acción de las células NK y la línea OPM-2 sensible, dado los resultados obtenidos anteriormente en cultivos semi-sólidos. En el caso de la línea L-363, se observó que las células NK tanto de donantes como de pacientes destruyen un menor porcentaje de células clonogénicas que de células tumorales totales para todas las ratios

utilizadas. La mayor diferencia se produjo a una ratio de 16:1 tanto para donantes (27,36%) como para pacientes (17,38%). En el caso de NKs de pacientes, las diferencias resultaron estadísticamente significativas a ratios 16:1 y 32:1 (figura 14 A).

Para la línea OPM-2, se observó mayor actividad sobre la célula tumoral clonogénica, que fue ligeramente superior en el caso de donantes. A concentraciones elevadas de células NK (32:1 y 16:1) se apreció una mayor destrucción de células clonogénicas que de células totales de MM tanto en el caso de NKs de donantes como de NKs de pacientes (figura 14 B).

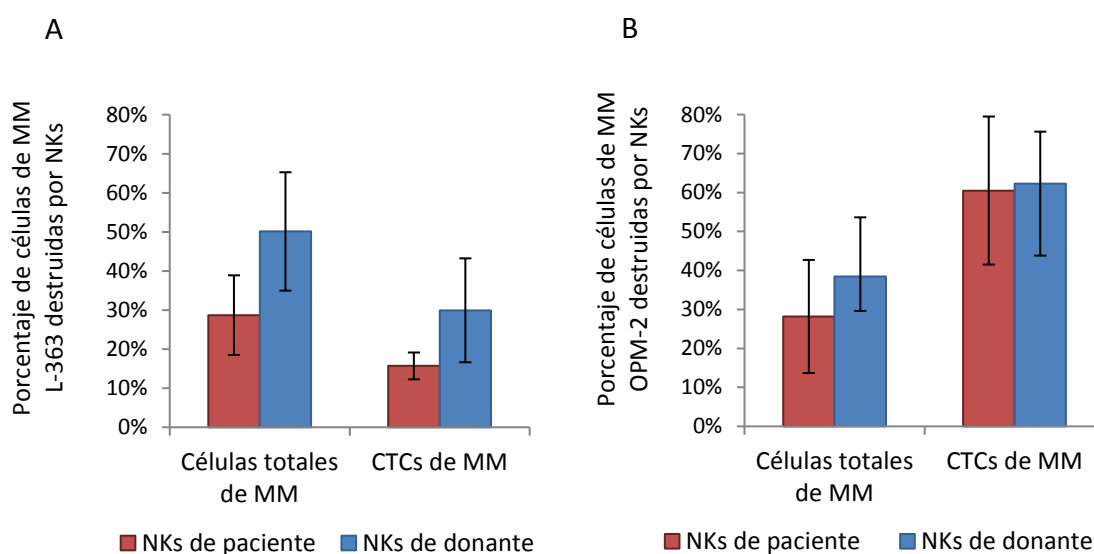
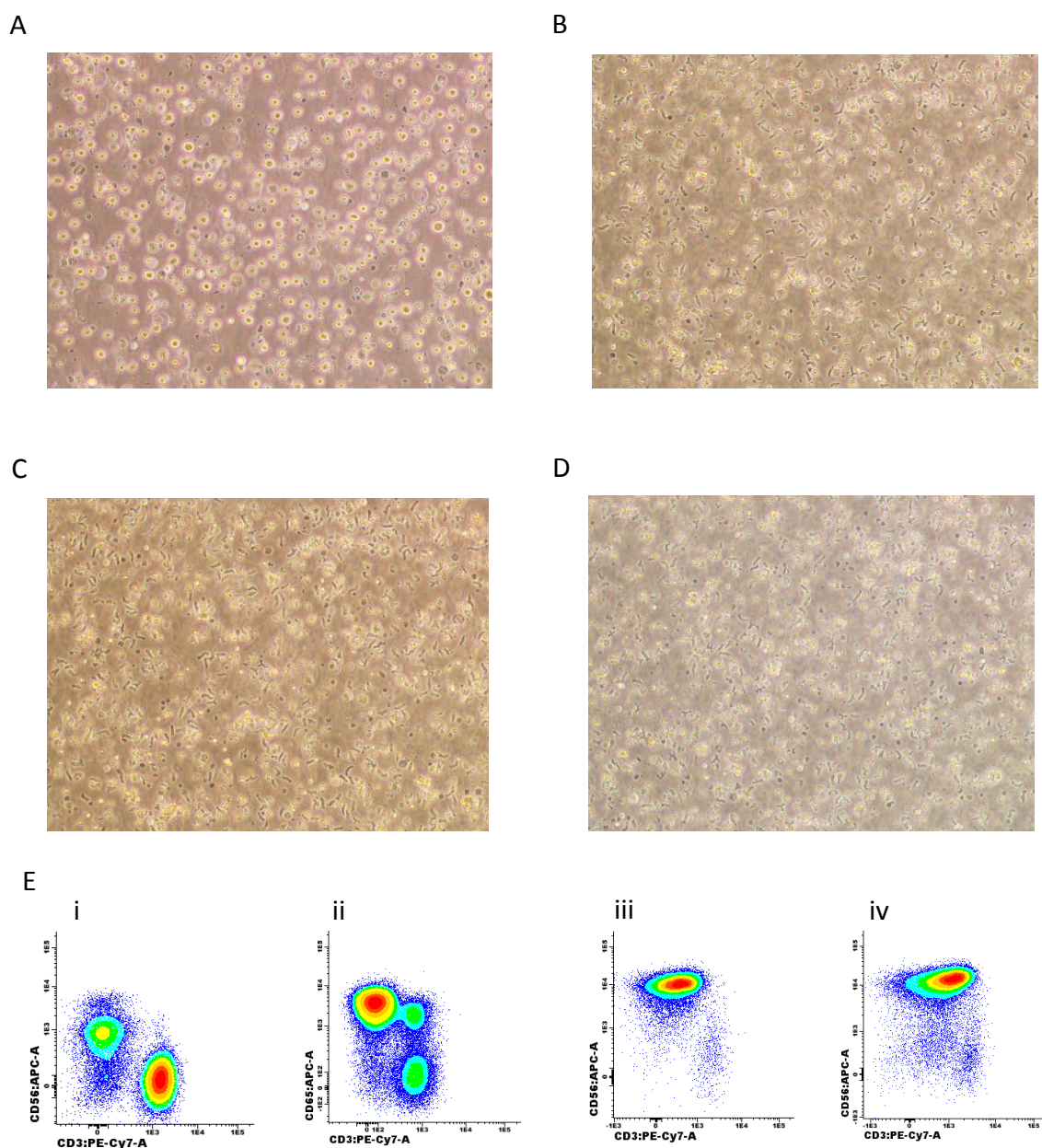


Figura 14. **Destrucción de células tumorales totales de MM y de células tumorales clonogénicas de las líneas L-363 y OPM-2.** Gráficas representativas de la actividad citotóxica de células NK procedentes de donantes y de pacientes sobre las líneas L-363 (A) y OPM-2 (B) a una ratio 32:1. Los resultados representan la media  $\pm$  DE de un mínimo de 5 experimentos independientes para cada muestra de NKs (donantes o pacientes) y para cada célula de MM (totales o células tumorales clonogénicas: CTCs), y se expresan como el porcentaje de células de MM destruidas. \*  $p < 0,05$  frente a células totales de MM.

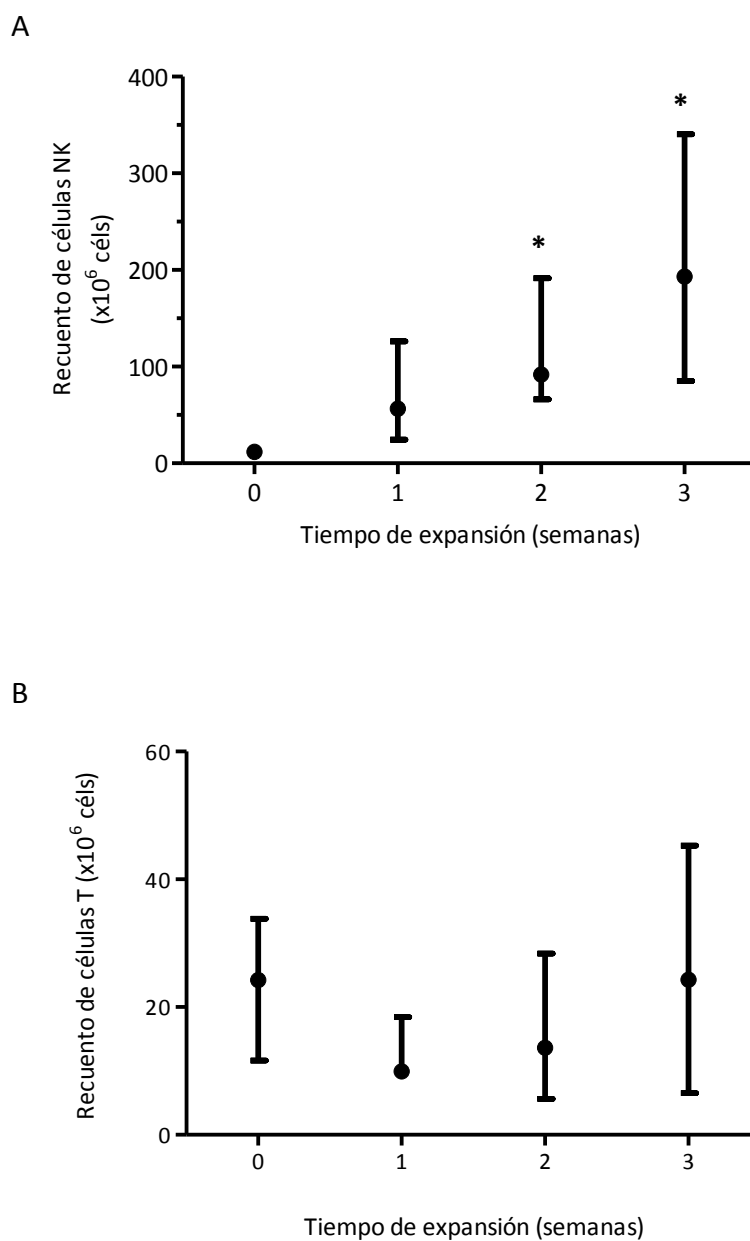
## 1.2. Activación y expansión de células NK de pacientes con MM

Se realizaron 10 procesos de expansión de células NK de pacientes a partir de CMSPs *in vitro* mediante el método descrito (figura 15 A-D). Pese a expandir las células a partir de una cantidad pequeña de muestra de SP (entre 8 y 16 ml) fue posible obtener grandes cantidades de células NKAe en la mayoría de casos, aunque el número de células obtenido fue muy variable. Se partió de un número de células NK de  $11,74 \cdot 10^6$  (rango:  $3,4 \cdot 10^6 - 21,44 \cdot 10^6$ ) que suponían un 26,3% (IQR 6,2%) de las CMSP obtenidas (figura 15.E y figura 16.A). Tras la primera semana de cultivo, el número de células NK se multiplicó por 4,8 alcanzando un valor de  $56,55 \cdot 10^6$  células NKAe (rango:  $0,48 \cdot 10^6 - 172,7 \cdot 10^6$ ) suponiendo ya un 61,1% (IQR 25,63%) de las CMSPs presentes en cultivo. En la segunda semana de expansión el número de células NKAe aumentó a un valor de  $92 \cdot 10^6$  (rango:  $25,8 \cdot 10^6 - 359,4 \cdot 10^6$ ), lo que representa un aumento de 7,84 veces y el porcentaje de pureza en NKAes alcanzó el 69,8% (IQR 25,35%). Finalmente, tras la tercera semana de cultivo, el número de células NKAe se multiplicó por 16,5 ascendiendo a  $193,3 \cdot 10^6$  (rango:  $65,1 \cdot 10^6 - 1032,8 \cdot 10^6$ ). El porcentaje de pureza final fue del 72,5% (IQR 20,38%).

Aunque se utilizaron muestras autólogas de los pacientes, se analizó también la presencia de linfocitos T en los cultivos (figura 16 B). El número medio inicial de linfocitos T CD3<sup>+</sup> era de  $25,22 \cdot 10^6$  (rango:  $6,09 \cdot 10^6 - 49,8 \cdot 10^6$ ), representando un porcentaje de CMSPs muy superior al de células NK (53,85%, IQR 26,2%). Tras la primera semana de expansión, el número de linfocitos T se redujo a  $9,9 \cdot 10^6$  (rango:  $2,82 \cdot 10^6 - 40,6 \cdot 10^6$ ) suponiendo ya únicamente un 12,75% (IQR 15,43%) de las CMSP presentes en el cultivo. A partir de este momento, tras la segunda semana de expansión, el número de linfocitos T se mantuvo en  $13,6 \cdot 10^6$  (rango:  $3,18 \cdot 10^6 - 31,4 \cdot 10^6$ ) pero el porcentaje relativo al resto de poblaciones se redujo al 10% (IQR 7,33%). Al finalizar los 21 días de cultivo, el número medio de linfocitos T aumentó ligeramente hasta  $24,29 \cdot 10^6$  (rango:  $2,02 \cdot 10^6 - 53,04 \cdot 10^6$ ) pese a que en 6 de las 10 expansiones el número de linfocitos T se redujo considerablemente, y el porcentaje se redujo también ligeramente hasta 9,65% (IQR 11,9%). Sólo en un caso el porcentaje de linfocitos T superó el 20%.



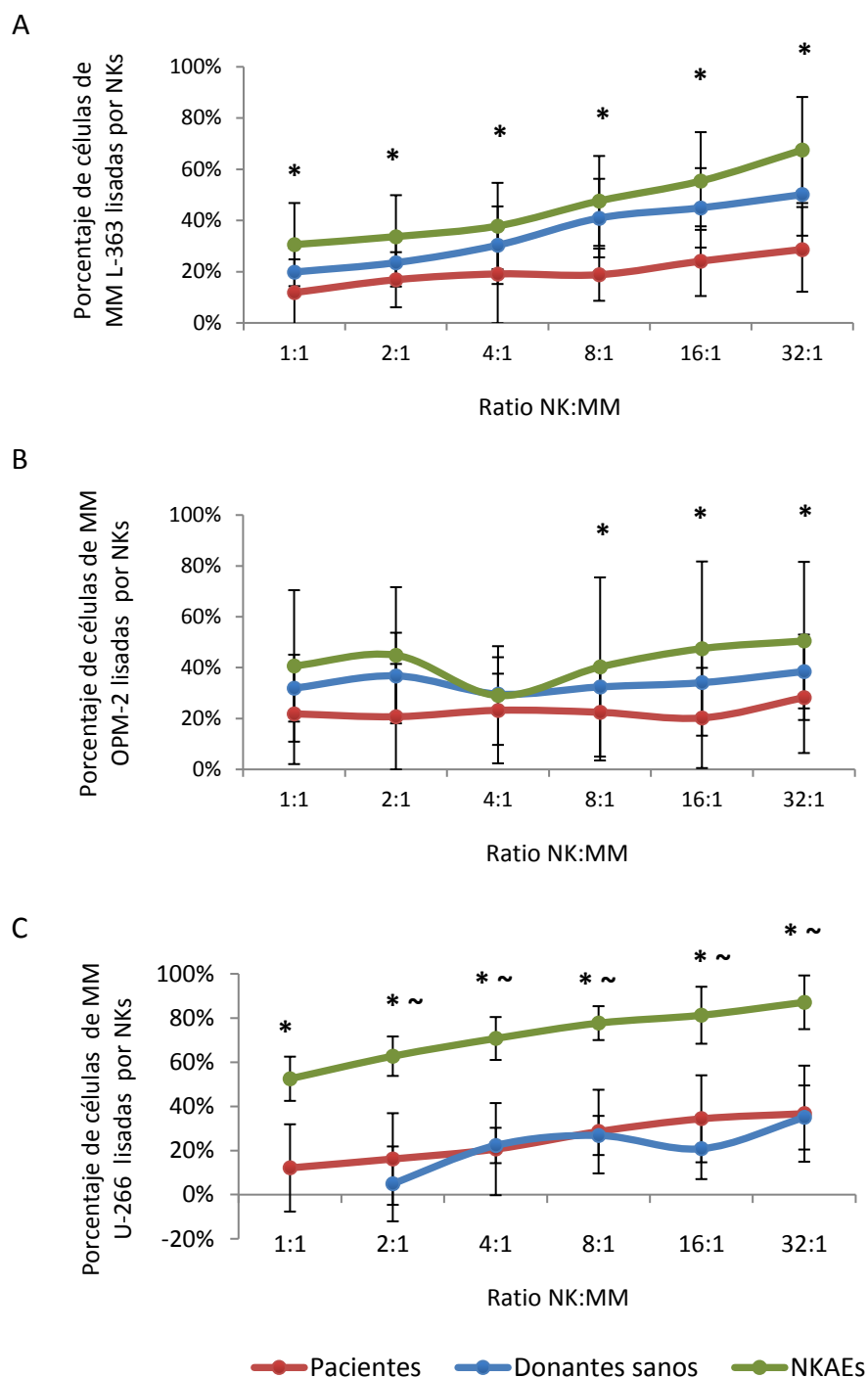
**Figura 15. Cultivo y obtención de células NKA.** Imágenes de microscopía óptica en campo claro (400X) representativas del proceso de expansión de células NKA a partir de CMSPs de pacientes en distintos puntos temporales del proceso. En la imagen a día 0 (**A**) se aprecia la presencia tanto de CMSPs (pequeñas y refringentes) como de las células K562-mb15-41BBL irradiadas (grandes con núcleo oscuro). A día 7 (**B**) empiezan a proliferar las células NKA y adoptan una morfología alargada y polarizada, aumentando en número a día 14 (**C**) y al final del cultivo a día 21 (**D**) en detrimento de las K562-mb15-41BBL que van muriendo por efecto de la radiación y de la acción de las NKA presentes en el cultivo. (**E**) Análisis por CMF del proceso de expansión de NKA. En los diagramas de puntos representativos se puede observar el aumento del porcentaje de células NKA CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> en cada semana del proceso desde el día 0 (**i**), día 7 (**ii**), día 14 (**iii**) hasta día 21 (**iv**).



**Figura 16. Obtención de células NKAE.** Gráficas representativas del proceso de expansión de células (cél/s) NK **(A)** y de la evolución de las células T durante la expansión **(B)**. Los datos representan la mediana con el rango intercuartil (IQR) de 10 experimentos independientes y se representan como el número de células presente en cada semana de expansión. \*  $p < 0,05$  frente a día 0.

### 1.3. Capacidad citotóxica de las células NKAE frente a la célula de MM y frente a la célula tumoral clonogénica

Se realizaron los mismos experimentos funcionales descritos anteriormente, pero con células NKAE obtenidas a partir de células NK de pacientes con MM. En los estudios de citotoxicidad sobre células de MM en suspensión se observó que las células NKAE poseían una capacidad de destrucción de células de MM totales muy superior a la de células NK de pacientes e, incluso, superior a la de células NK de donantes. Esta diferencia se observó con todas las ratios utilizadas frente a las tres líneas celulares y se pudo apreciar que la actividad citotóxica de las células NKAE era totalmente dependiente de la concentración en todos los casos. Sólo se observó una pérdida de la linealidad en el caso de la línea OPM-2, a una ratio 4:1 debido a la presencia de valores extremos que influyeron en la media final calculada (figura 17 B). A una ratio máxima de 32:1 las células NKAE destruyeron el  $67,52\pm 20,7\%$ ,  $50,5\pm 31,1\%$  y  $87,11\pm 12,16\%$  de las células de MM en suspensión de L-363, OPM-2 y U-266 respectivamente. Mientras que a una ratio mínima de 1:1 la destrucción fue de  $30,6\pm 16,2\%$ ,  $40,7\pm 29,8\%$  y  $52,5\pm 10\%$  para cada una de las líneas, L-363, OPM-2 y U-266 respectivamente. La mayor diferencia apreciada se produjo frente a la línea U-266, sobre la cual las NKAE destruyeron un 52,2% más que las células NK de pacientes y un 50,45% más que las células NK de donantes (figura 17 C). La menor diferencia se produjo frente a la línea OPM-2 mostrando una capacidad de destrucción sólo un 12% superior a la de células NK de donantes a una ratio de 32:1 (figura 17 B). En cambio, la diferencia fue mucho mayor cuando se comparó con la actividad de células NK de pacientes de MM (21,7%). Frente a la línea L-363, que previamente ya había mostrado ser resistente a la acción de las NK, sólo se observó un aumento de la citotoxicidad mínimo en comparación con el producido frente a las OPM-2 en el caso de NKs de donantes a ratio 32:1 (figura 17 A). Aun así, las células NKAE destruyeron un 17,4% más de células L-363 que las NK de donantes, pero, cuando se comparó la actividad de las células NKAE con la de NKs de pacientes se observó una diferencia mucho mayor (38,82%).

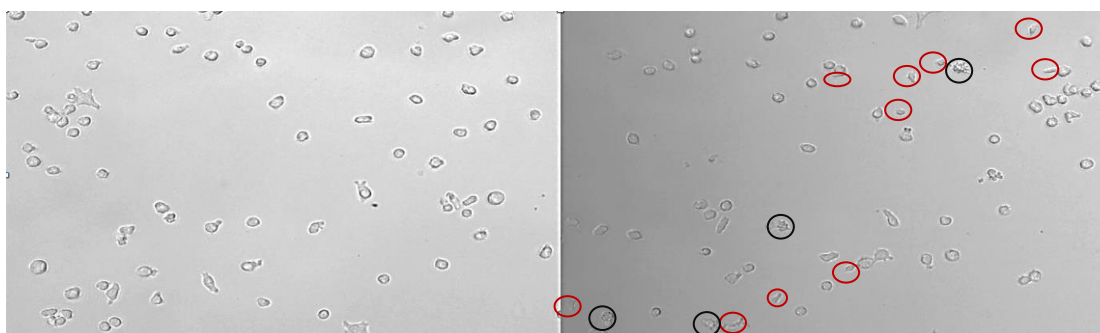


**Figura 17. Las células NKAe procedentes de pacientes recuperan la actividad citotóxica frente a células de MM en suspensión.** Se evaluó la actividad citotóxica de células NKAe obtenidas frente a tres líneas celulares de MM: L-363 (A), OPM-2 (B) y U-266 (C). Los resultados representan la media  $\pm$  DE de un mínimo de 4 experimentos independientes para cada línea celular de MM y cada ratio, y se expresan como el porcentaje de células de MM lisadas por las células NKAe. Se mantienen los datos de NKs de pacientes y de donantes para poder apreciar las diferencias. \*  $p < 0,05$  NKAes respecto a pacientes para la misma ratio, ~  $p < 0,05$  respecto a donantes.

Asimismo, de manera complementaria, se evaluó la actividad citotóxica mediante microscopía *in vivo* frente a una línea celular de MM (RPMI-8226) para poder visualizar *in situ* la actividad citotóxica previamente cuantificada (ver video ANEXO III). Se observó que las células NKAЕ, obtenidas de paciente, eran capaces de abandonar el flujo de medio de cultivo en el que se encontraban, adyacente al lecho monocapa de células de MM, para ir a buscar las células tumorales de MM. Se apreció también que cada célula de MM recibía múltiples contactos efectivos (sinapsis inmunológicas) con NKAЕs para, posteriormente, entrar en un proceso de necrosis o apoptosis y que cada célula NKAЕ podía contactar con varias células de MM diferentes desplazándose rápidamente (figura 18 A, derecha). No obstante, poco o nada de esto se observó cuando el flujo establecido contenía células NK procedentes del mismo paciente previo a la expansión de NKAЕs (figura 18 A, izquierda). Los pocos contactos que las células NK pre-expansión realizaron fueron poco duraderos y no se tradujeron directamente en una necrosis/apoptosis de las células de MM. Las diferencias observadas entre los canales por los que circulaban NKs o NKAЕs resultaron estadísticamente significativas tanto al comparar el número de contactos recibidos por las células de MM en cada campo del canal ( $p=0,000$ ) como por el número de células que entraron en apoptosis o en necrosis ( $p=0,026$ , figura 18 B).



A



B

	Contactos		Necrosis/Apoptosis de células de MM	
NK (de paciente)	2	2	0	0
	4	0	0	0
NKAEs* (de paciente)	16	19	6	6
	22	17	2	7

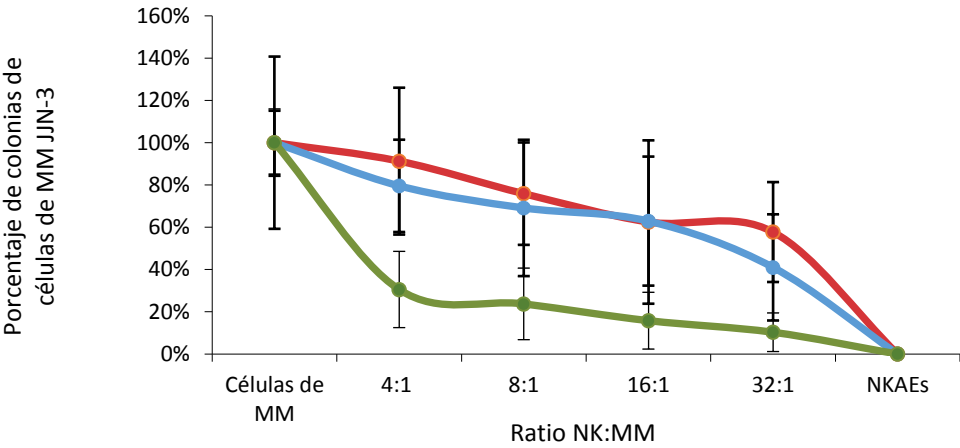
**Figura 18. Actividad de las células NKAe *in vivo*.** (A) Imagen representativa del estudio de microscopía *in vivo* realizado. Se resaltan las células NKAe adheridas (círculo rojo) al lecho de células de MM y las células de MM que entraron en necrosis/apoptosis (círculo negro, imagen derecha) en contraposición con la imagen de células NK (izquierda). (B) Se cuantificó el número de contactos entre células NK o NKAe y células de MM durante los 20 minutos que duró el flujo (contactos) para, posteriormente, cuantificar el número de células de MM que entraron en necrosis o en apoptosis tras el contacto con NKs/NKAes (Necrosis/Apoptosis de células de MM). Se muestran los valores obtenidos en cada uno de los cuatro cuadrantes analizados para demostrar la representatividad del proceso. \*  $p < 0,05$  respecto a NKs (tanto para contactos como para necrosis).

Paralelamente, se analizó el potencial citotóxico de las células NKAe frente a la célula tumoral clonogénica de MM. Se apreció que la actividad citotóxica de las células NKAe era superior a la de NKs de pacientes e, inclusive, a la de NKs de donantes. Curiosamente, este efecto se apreció a ratios bajas. A una ratio mínima de 4:1 el

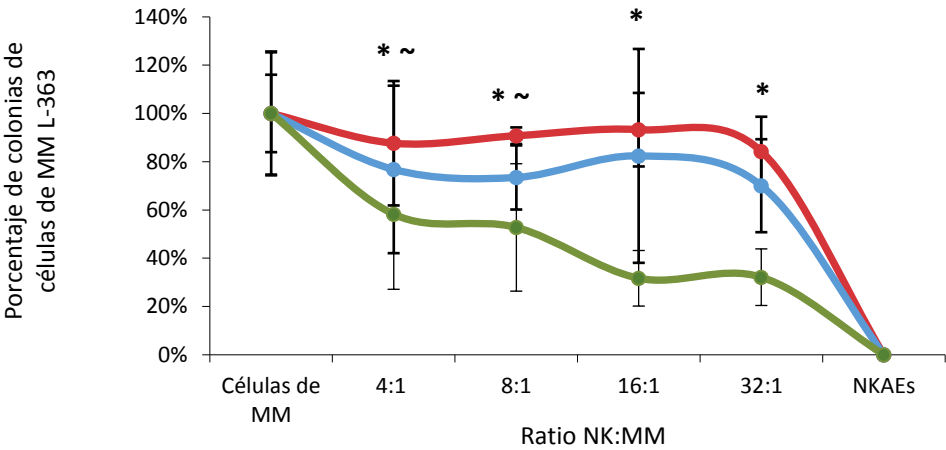
porcentaje de destrucción de células de MM fue de  $69,4\pm 18\%$ ,  $41,74\pm 31,1\%$ ,  $39,4\pm 23,1\%$  y  $89,23\pm 11,27\%$  para las líneas JJN-3, L-363, OPM-2 y RPMI-8226 respectivamente (figura 19 y 20). A una ratio máxima de 32:1 el porcentaje de destrucción mejoró considerablemente en todos los casos:  $89,6\pm 9,12\%$ ,  $67,85\pm 11,7\%$ ,  $60,27\pm 22,76\%$  y  $99,10\pm 2,7\%$  para JJN-3, L-363, OPM-2 y RPMI-8226 respectivamente (figura 19). La destrucción máxima de células clonogénicas se produjo frente a la línea RPMI-8226 llegando casi a una destrucción de células clonogénicas completa. Las NKAes mejoraron la actividad de las NK de pacientes sobre las células clonogénicas de células RPMI-8226 en un 38,35% y la de NKs de donantes en un 11,6% a una ratio de 32:1 (figura 19 D y 20). En todos los casos se comprobó la ausencia de contaminación cultivando únicamente con células NKAe para descartar la presencia de colonias no pertenecientes a células de MM.

Así como en el caso de donantes y de pacientes, la línea que mostró ser más resistente fue la L-363, no ocurrió de igual manera cuando se expuso a células NKAe, aunque en este caso la mayor diferencia se apreció a ratios más elevadas. A 16:1, el porcentaje de células clonogénicas de L-363 destruidas por las NKAe fue un 61,56% superior que el producido por células NK de pacientes y hasta un 50,7% superior al producido por células NK de donantes. Es más, frente a esta líne celular se observó la mayor diferencia de citotoxicidad entre pacientes/donantes y NKAes (figura 19 B). Se observó también una gran diferencia en la destrucción de células clonogénicas de la línea JJN-3 a 16:1, las NKAes destruyeron un 46,66% más de células clonogénicas que las NK de pacientes y un 47,09% más que las NKs de donantes sin llegar a la concentración máxima de NKAes (figura 19 A). La línea OPM-2 resultó ser la más resistente a la acción de las NKAes. A una concentración máxima (ratio 32:1) el porcentaje de destrucción de células clonogénicas fue prácticamente equivalente al producido por NKs de pacientes y por las de donantes. Fue a ratios menores donde se apreció cierta diferencia en la actividad. A una ratio 8:1 las NKAes mostraron mayor capacidad de destrucción que las NKs de pacientes (33,32% superior) y de donantes (20,44% superior) sobre esta línea (figura 19 C).

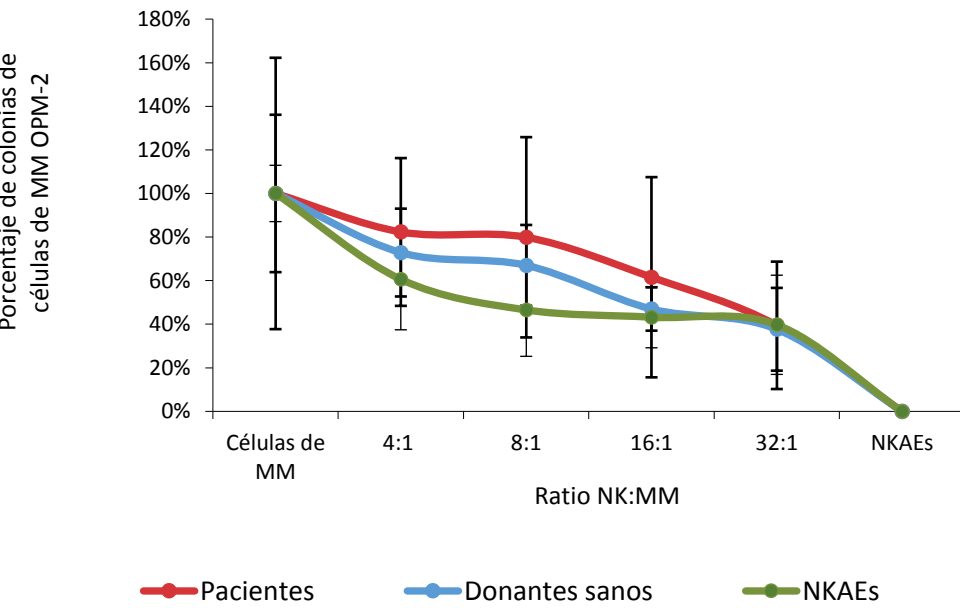
A



B

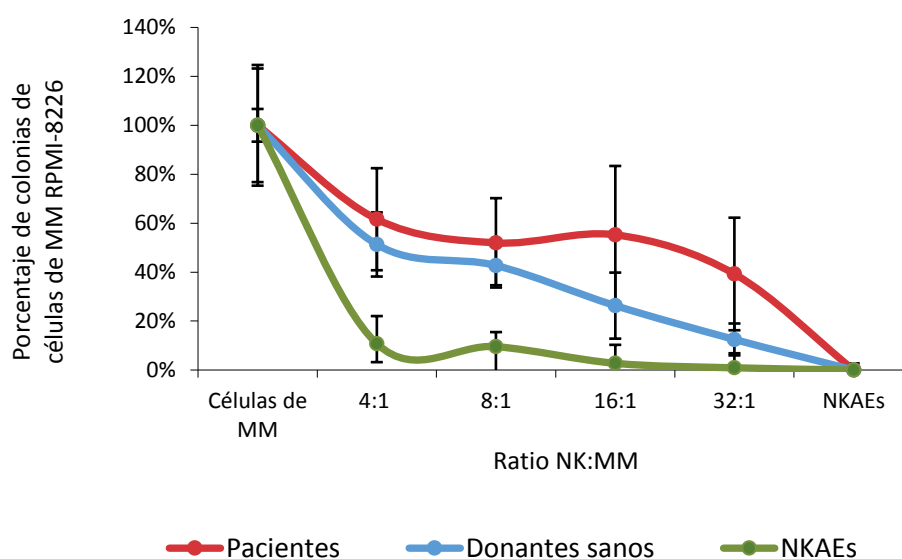


C



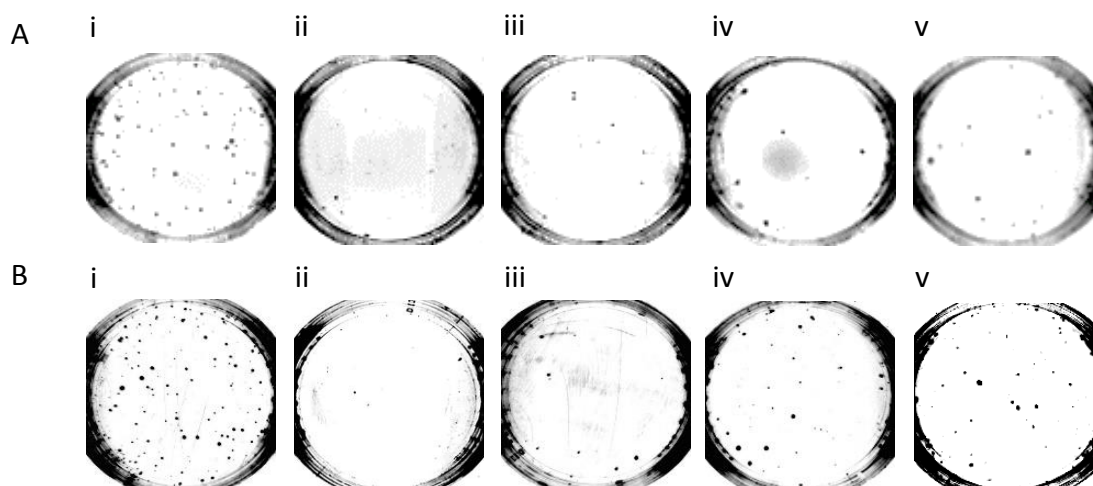
● Pacientes      ● Donantes sanos      ● NKAEs

D



**Figura 19. Las células NKAe destruyen la célula clonogénica de MM.** Se analizó la actividad citotóxica de células NKAe procedentes de pacientes en medio semi-sólido frente a cuatro líneas celulares de MM: JJN-3 (A), L-363 (B), OPM-2 (C) y RPMI-8226 (D). Los resultados representan la media  $\pm$  DE de un mínimo de 3 experimentos independientes para cada línea celular de MM y cada ratio, y se expresan como el porcentaje de colonias de MM crecidas tras 14 días de cultivo previa exposición a NKs, en función del porcentaje de crecimiento de colonias de MM (que no han sido expuestas a NKs). Se muestran los resultados de NKs de pacientes y de donantes para poder apreciar con facilidad las diferencias observadas.

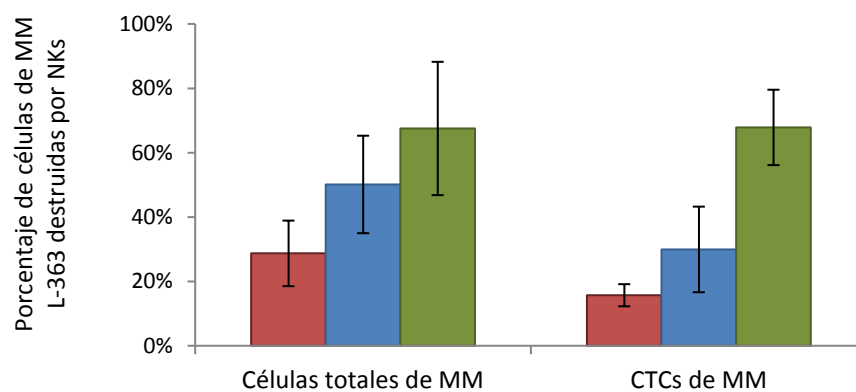
\*  $p < 0,05$  NKAEs respecto a pacientes para la misma ratio,  $\sim p < 0,05$  respecto a donantes.



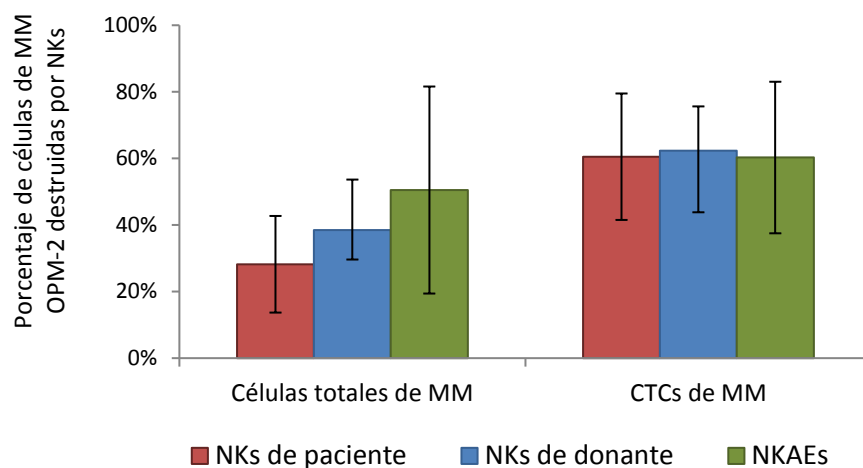
**Figura 20. Cultivos de células de líneas de MM en metilcelulosa.** Imágenes representativas de los cultivos de metilcelulosa previa exposición de las células de MM a células NK y NKAE y observación de las colonias tras 14 días de cultivo. Las imágenes muestran las colonias de la línea de MM RPMI-8226 tras exposición a células NK procedentes de donantes **(A)** y a células NKAE obtenidas de pacientes con MM **(B)**. De izquierda a derecha se muestra: **(i)** colonias de células de MM no enfrentadas a células NK/NKAE, **(ii)** colonias de células de MM previamente expuestas a células NK/NKAE a una ratio 32:1, **(iii)** 16:1, **(iv)** 8:1 y **(v)** 4:1.

Se comparó la actividad de las células NKAE frente a células tumorales totales en suspensión con la de NKAes frente a células clonogénicas para las líneas L-363 y OPM-2. Se pudo observar que las NKAes destruían prácticamente por igual las células totales de MM como sus células clonogénicas para estas dos líneas. En el caso de la línea L-363 se observa un aumento notable de la citotoxicidad sobre todo frente a células clonogénicas mejorando la actividad de las NKs de pacientes en un 52,15% (ratio 32:1) frente a un 38,82% de mejoría frente a células tumorales totales (figura 21 A). En este caso se puede apreciar que las NKAes poseen actividad preferente sobre las células clonogénicas de MM pese a que parecía ser la línea con mayor resistencia a la acción de las células NK. En el caso de la línea OPM-2 la mejoría no fue tan notable frente a células clonogénicas ya que la destrucción de células clonogénicas por parte de NKs de pacientes y de donantes ya era elevada (se mantuvo siempre entorno al 60%), mientras que sí se apreció frente a células totales de MM (figura 21 B).

A



B



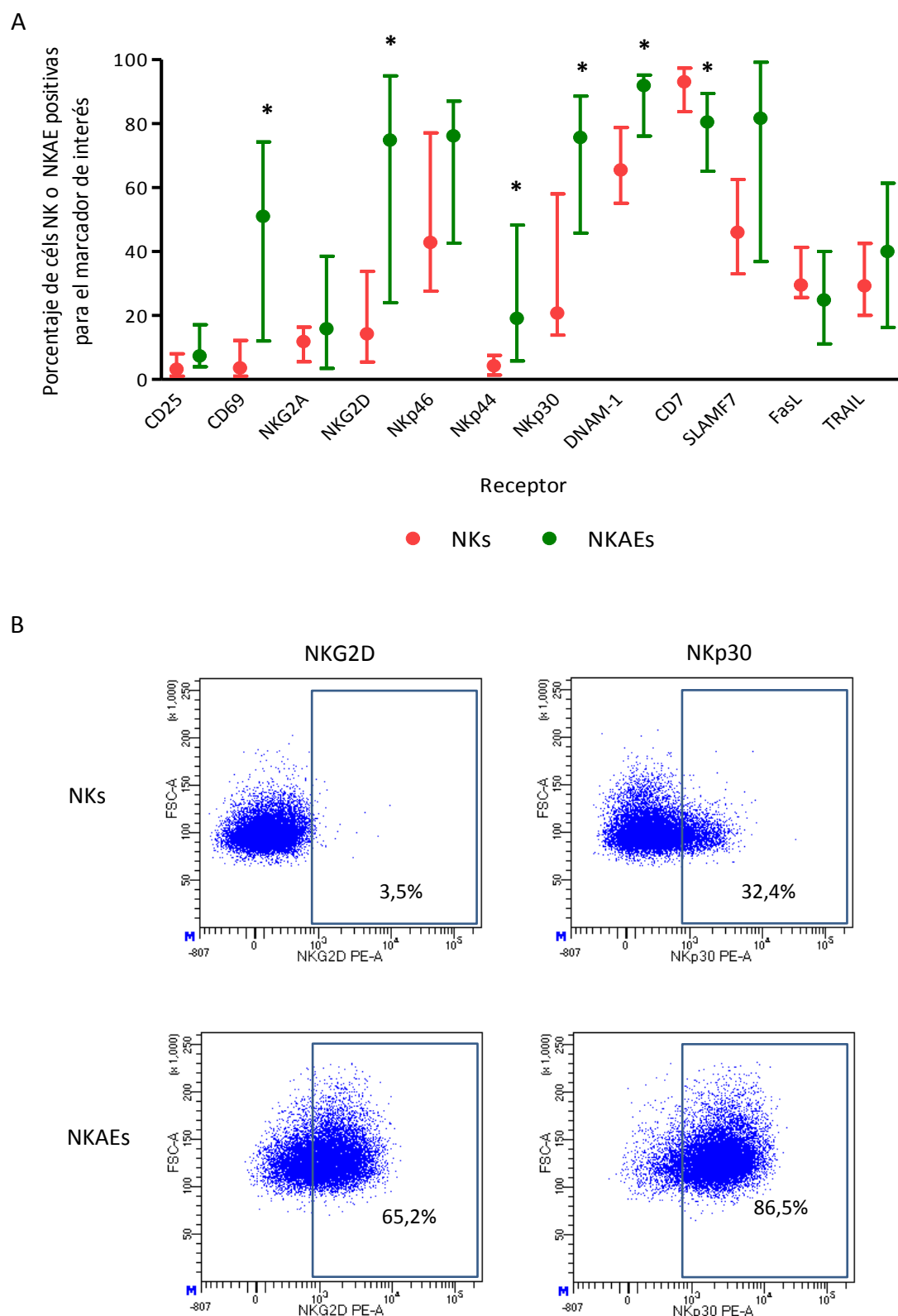
**Figura 21. Destrucción de células tumorales totales de MM y de células clonogénicas de las líneas L-363 y OPM-2.** Gráficas representativas de la actividad citotóxica de células NKAe procedentes de pacientes sobre las líneas L-363 (A) y OPM-2 (B) a una ratio 32:1. Los resultados representan la media  $\pm$  DE de un mínimo de 3 experimentos independientes para cada muestra de NKAEs y para cada célula de MM (totales o células clonogénicas: CTCs), y se expresan como el porcentaje de células de MM destruidas en comparación con el crecimiento autónomo de células de MM. Se mantienen los resultados obtenidos con NKs de pacientes y de donantes para poder apreciar las diferencias. \*  $p < 0,05$  frente a células totales de MM.

## 2. EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE LOS RECEPTORES DE SUPERFICIE EN NKAES

### 2.1. Expresión de receptores de citotoxicidad en células NKAES

Mediante CMF se caracterizó el perfil de expresión de receptores de membrana implicados en la citotoxicidad de las células NK (n=23) y NKAES (n=14). Se pudo observar que, en general, la expresión de los receptores en NKAES aumentó para la mayoría de marcadores analizados, observándose un mayor porcentaje de células positivas salvo para el ligando de apoptosis FasL (CD178) y el receptor CD7, en los que el número de células positivas disminuyó en un 6,65% y en un 14,3% respectivamente. En el caso de FasL sin diferencias significativas ( $p=0,787$ ) pero, en el caso de CD7, sí que se apreció que esta disminución era estadísticamente significativa ( $p=0,04$ ). Otro ligando de apoptosis, TRAIL, mostró una tendencia a aumentar, el número de células positivas aumentó un 4,5%, pero este aumento no fue significativo ( $p=0,41$ ). El receptor CD69 ( $p=0,002$ ), implicado en activación temprana, así como los receptores de citotoxicidad natural, NKp44 ( $p=0,011$ ) y NKp30 ( $p=0,011$ ) se encontraron aumentados de manera significativa en células NKAES en un 13,4%, 44,1% y 50,8% respectivamente. Estas diferencias evidencian el estado de activación de las células NKAES obtenidas. Además, también se detectó que en NKAES el porcentaje de células que expresaban receptores responsables de la activación de células NK, como DNAM-1 y NKG2D aumentó en un 26,3% ( $p=0,006$ ) y en un 47,54% ( $p=0,002$ ) respectivamente de manera estadísticamente significativa. Las mayores diferencias se apreciaron en la expresión de NKp30 y NKG2D en la mayoría de casos (figura 22).

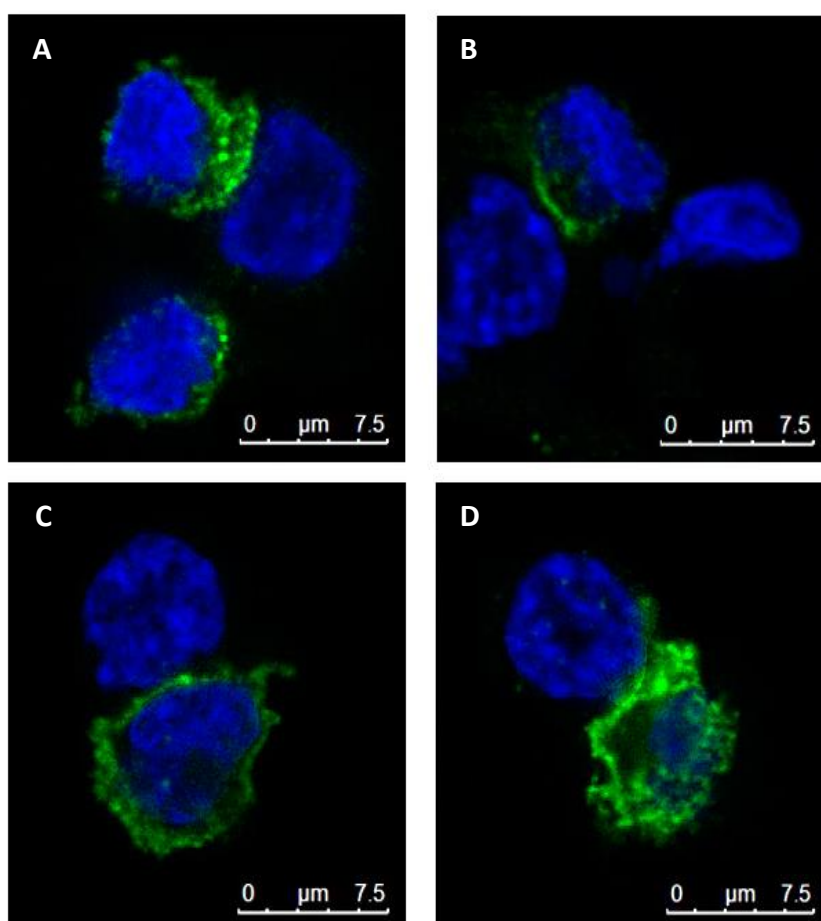
Otros receptores, como CD25, NKp46 y SLAMF7, para los que también se vio un aumento del porcentaje de células positivas (3,9%, 33,3% y 21,7% respectivamente), éste resultó no ser estadísticamente significativo ( $p=0,149$ , 0,235 y 0,221 respectivamente). Por otro lado, NKG2A, cuya función es inhibidora no se encuentra diferencialmente expresado en NKAES, lo que va en consonancia con el resto de resultados obtenidos (figura 22).



**Figura 22. Inmunofenotipo de membrana de receptores de células NK y NKAe. (A)** Gráfica comparativa del porcentaje de células (cél)s NK de pacientes y NKAe positivas para los receptores analizados por CMF. Los datos representan la mediana con el IQR de un mínimo de 14 experimentos independientes. \*  $p < 0,05$  con respecto a células NK. **(B)** Diagramas de puntos representativos del aumento del número de células positivas para NKG2D y Nkp30 en NKAes en comparación con NKs del propio paciente sin expandir.



Se estudió más en detalle la expresión de los receptores NKp30 y NKG2D, ya que fueron los que mostraban mayores diferencias entre NKs y NKAes (figura 22 B), mediante inmunomarcaje fluorescente. Se evaluó la presencia y localización de estos dos receptores en las células NKAes una vez enfrentadas a células de MM. Tanto NKG2D como NKp30 se encontraban presentes en abundancia por toda la membrana celular de las NKAes (figura 23 A) y no se detectó en ningún momento su presencia en células de MM. Se pudo apreciar que, aunque no se detectó un patrón de distribución específico exclusivo en la sinapsis inmunológica producida entre NKAes y células de MM, en algunos casos sí que se observó su presencia en la sinapsis o, al menos, cierta polarización hacia la sinapsis inmunológica (figura 23 B).



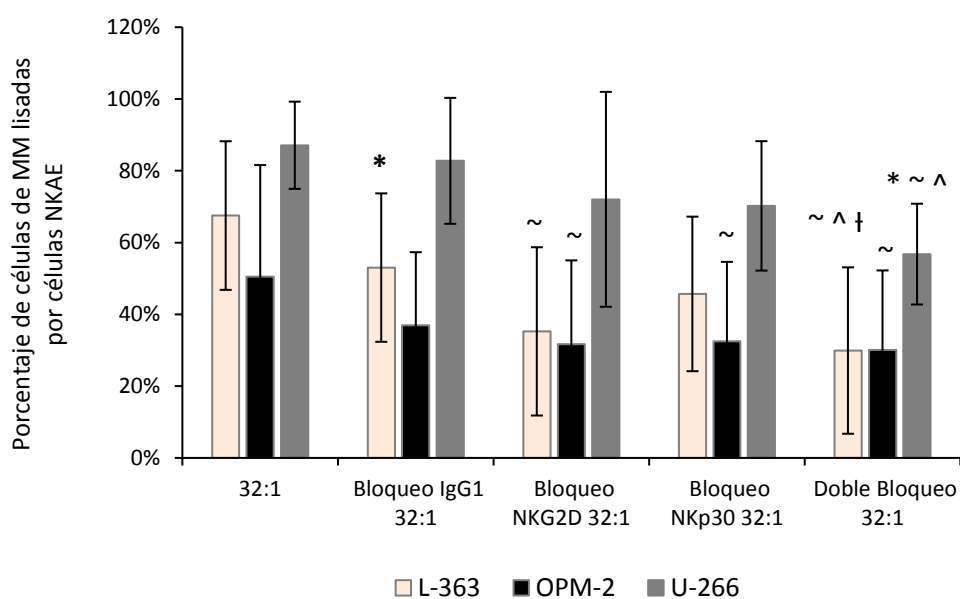
**Figura 23. Detalle de la presencia y distribución de NKG2D y NKp30 en NKAes en contacto con células de MM.** Microscopía confocal. **(A)** NKG2D (verde) se encuentra repartido por la membrana celular de las células NKAes con polarización, en algunos casos, hacia la zona de la sinapsis inmunológica. **(B)** En casos puntuales se observó localización exclusiva en la sinapsis inmunológica. **(C)** NKp30 (verde) posee un patrón de distribución similar al de NKG2D (630X), **(D)** aunque la polarización fue menos evidente pudo observarse en algún caso. Los núcleos se tiñeron con DAPI.

## 2.2. Efecto del bloqueo de los receptores NKG2D y NKp30 en la citotoxicidad de las células NKAЕ

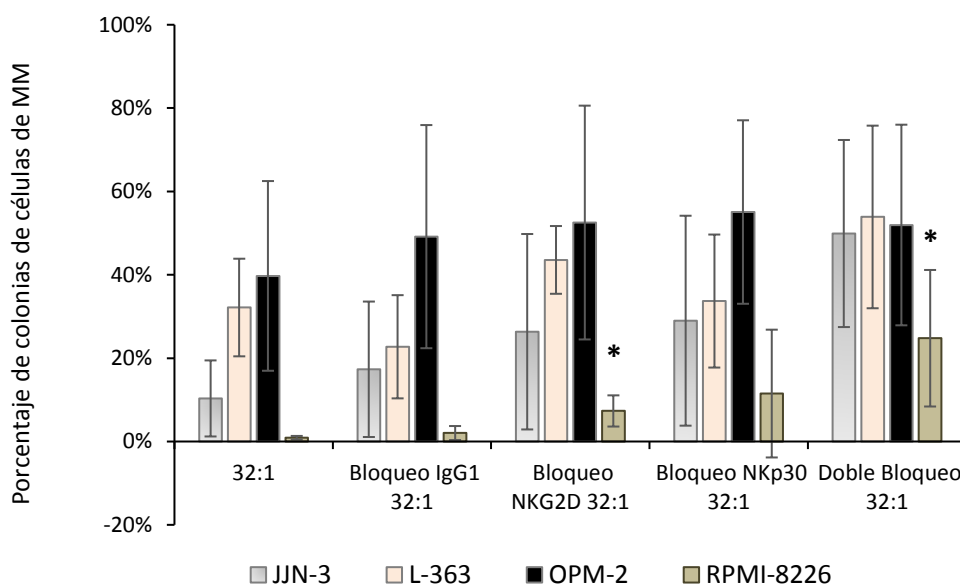
El papel de los receptores NKG2D y NKp30 fue analizado realizando los experimentos funcionales anteriormente descritos previo bloqueo de estos receptores mediante el uso de anticuerpos monoclonales. Los experimentos de citotoxicidad en suspensión revelaron que en las tres líneas celulares de MM utilizadas se produjo una disminución de la citotoxicidad de las NKAЕ debida al bloqueo específico del receptor NKG2D y NKp30. En el caso de las células L-363 y OPM-2 el bloqueo de uniones inespecíficas, mediante el uso de una Ig inespecífica (IgG1), produjo una reducción de la citotoxicidad en un 14,5% y un 13,5% respectivamente, pero se observó un efecto mayor al bloquear los receptores de manera específica (figura 24 A). El bloqueo de NKG2D produjo una reducción adicional de la citotoxicidad de 17,8% y el de NKp30 una reducción de 7,3% en el caso de L-363. No resultó tan notable la reducción en el caso de OPM-2, que fue de 5,3% y 4,45% para NKG2D y NKp30 respectivamente. En el caso de la línea U-266, el bloqueo inespecífico no supuso una variación significativa de la citotoxicidad y se observó una reducción adicional importante de la citotoxicidad de 10,7 % y 12,55% al bloquear NKG2D y NKp30 respectivamente. El bloqueo conjunto de los dos receptores mostró un efecto aditivo, en todos los casos. Se observó una reducción adicional respecto al bloqueo inespecífico de 23,1%, 6,8% y 26% para L-363, OPM-2 y U-266 respectivamente (figura 24 A). El menor efecto se observó en las líneas con menor sensibilidad a la acción de las células NKAЕ, como la línea OPM-2, que ya demostró ser más resistente en experimentos funcionales anteriores.

Cuando se realizaron estudios sobre la célula tumoral clonogénica los resultados fueron similares a los obtenidos en células tumorales en suspensión. En el caso de las líneas L-363 y OPM-2, el bloqueo con IgG1 produjo un aumento del número de colonias de 9,4%. El bloqueo específico de los receptores mostró un efecto más llamativo en L-363 en la que se produjo un aumento del número de colonias de 20,84% al bloquear NKG2D, 11% al bloquear NKp30 y 31,1% al realizar el bloqueo conjunto. Como era de esperar, no se obtuvo la misma respuesta con OPM-2 (figura 24 B). Sólo se produjo una reducción del número de colonias en 5,9% al bloquear NKp30, 3,4% al bloquear NKG2D y 2,8% al realizar el doble bloqueo.

A



B



**Figura 24. Papel de los receptores NKG2D y NKp30 en la actividad de células NKAE. (A)** El bloqueo de NKG2D y NKp30 en tres líneas celulares de MM (L-363, OPM-2 y U-266) produce una disminución de la citotoxicidad sobre células de MM en suspensión. Los datos representan la media  $\pm$  DE de un mínimo de 5 experimentos independientes. \*  $p < 0,05$  respecto a 32:1, ~  $p < 0,05$  respecto a IgG1, ^  $p < 0,05$  respecto a NKp30 y †  $p < 0,05$  respecto a NKG2D. **(B)** Este mismo bloqueo también produce una reducción del número de colonias de cuatro líneas celulares (JJN-3, L-363, OPM-2 y RPMI-8226) en cultivos de metilcelulosa. Los datos representan la media  $\pm$  DE de un mínimo de 5 experimentos independientes. \*  $p < 0,05$  respecto a IgG1.

La línea RPMI-8226 no sufrió modificaciones debidas al bloqueo inespecífico (1,1%) y fue sensible al bloqueo de NKp30 (9,5%), NKG2D (5,3%) y sobre todo al doble bloqueo de los receptores (22,75%). La línea JJN-3 respondió de igual manera, el bloqueo inespecífico redujo el número de colonias en un 7%, los bloqueos de NKp30 y NKG2D produjeron una reducción de 11,7% y 9% respectivamente, y 32,6% en el caso del doble bloqueo (figura 24 B).



### 3. DESTRUCCIÓN DE LA *SIDE POPULATION* DE MM POR LAS CÉLULAS NKA

#### 3.1. Caracterización de células de *side population* de MM

##### 3.1.1. Detección de *side population*

Se realizó la detección de células iniciadoras de tumor mediante la técnica de detección de *side population* por CMF. Se estudió la *side population* de 8 líneas celulares de MM (JJN-3, L-363, MM.1S, NCI-H929, OPM-2, RPMI-8226, SK-MM-2 y U-266), 8 muestras de MO de pacientes con MM y 1 muestra de SP de LCP. En todas ellas se evidenció la presencia de *side population* (figura 26 A-C). Para corroborar que las células observadas en la *side population* correspondían realmente a *side population* se realizó un control de inhibición con RES. Se realizaron pruebas con distintos inhibidores de bombas ABC en las líneas celulares: RES, verapamilo y fumitremorgina C (figura 25).

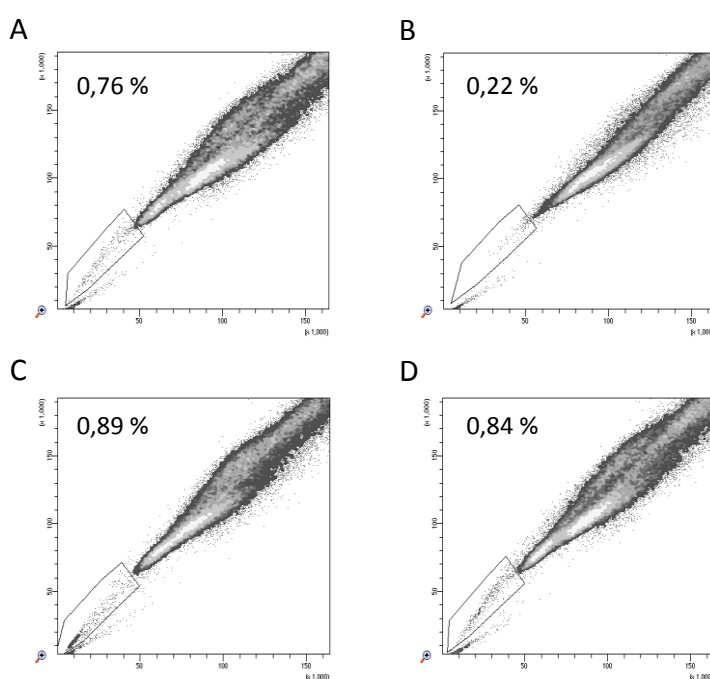
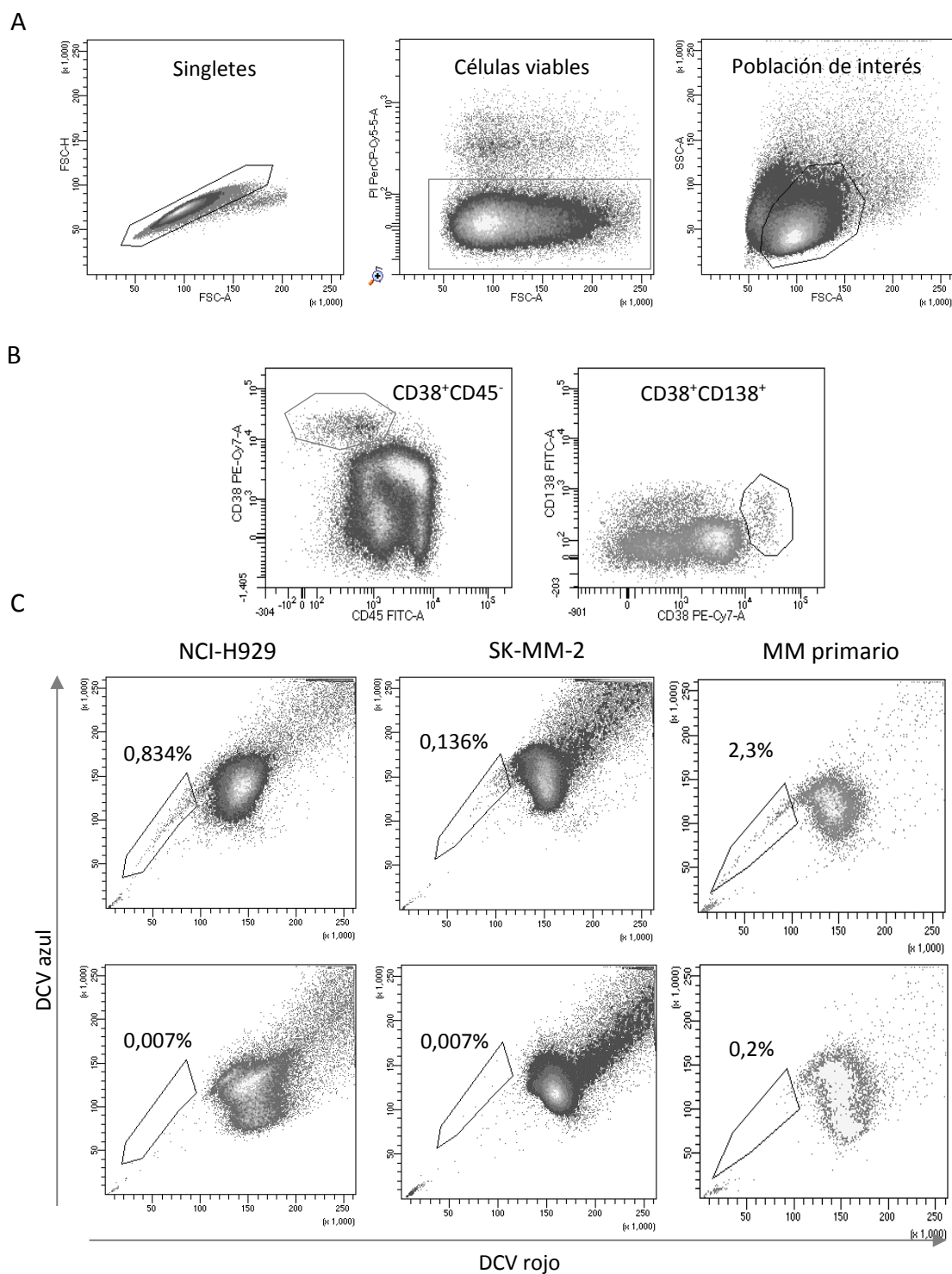


Figura 25. **Inhibición de la *side population***. Se caracterizó la disminución de la proporción de la *side population* en las diferentes líneas celulares utilizadas. Se muestran las gráficas representativas de las diferencias observadas en el porcentaje de *side population* (A) tras incubación con reserpina (B), fumitremorgina C (C) y verapamilo (D) en una de las líneas celulares (OPM-2).

Únicamente la RES fue efectiva en la mayoría de líneas de MM y por este motivo se usó como control de inhibición.

En el caso de líneas celulares, la RES no afectó por igual a todas las líneas. En las líneas L-363 y MM.1S no se observó una disminución debida al efecto de la RES. Se observó una *side population* de 0,4% y 0,2% en cada una de las dos líneas respectivamente. El porcentaje de células *side population* fue muy bajo en las líneas celulares de MM (rango: 0,136% - 11,9%), con excepción de la línea RPMI-8226 que mostró un porcentaje de *side population* de 11,9%, el resto de líneas estuvo por debajo del 2,2% como se puede apreciar en la tabla 11.



**Figura 26. Detección de *side population* en MM.** Diagramas de puntos representativos de la estrategia de análisis para la detección de *side population* mediante marcaje con DCV por citometría de flujo para **(A)** líneas celulares de MM y **(B)** células primarias de MM CD138<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>. **(C)** Diagramas de puntos representativos de la *side population* detectada en líneas celulares (izquierda y centro) y en muestras de pacientes (derecha). Se muestra la desaparición de la *side population* producida por la reserpina en cada caso (inferior).



En muestras procedentes de pacientes, se analizó la *side population* de células de MM CD138+CD38+ (figura 26 B-C y tabla 11). Al igual que en líneas celulares la *side population* representó un porcentaje muy pequeño de la población celular total (rango: 0,5% - 11,4%). En todos los casos se objetivó una reducción del porcentaje de *side population* en el control de inhibición, aunque la reducción fue variable para cada muestra.

Líneas celulares	Side pop.	Side pop. + RES	Pacientes	Side pop.	Side pop. +RES
JJN-3	1,3%	0,9%	1	1,9%	0,2%
L-363	0,4%	0,4%	2	1,48%	0,00%
MM.1S	0,2%	0,2%	3	2,3%	0,2%
NCI-H929	0,834%	0,007%	4	11,4%	1,3%
OPM-2	0,6%	0,1%	5	0,5%	0,4%
RPMI-8226	11,9%	4,5%	6	0,2%	0,2%
SK-MM-2	0,136%	0,007%	7	1,9%	1,2%
U-266	2,2%	0,1%	8	0,9%	0,6%

**Tabla 11. Resumen de las muestras analizadas para el estudio de la población *side population* y resultados obtenidos.** Se indican los porcentajes de *side population* (side pop.) obtenidos para cada una de las líneas celulares, así como para cada uno de los 8 pacientes. Asimismo, se indican los valores de *side population* obtenidos previa incubación con RES como control de inhibición. Para poder realizar una comparativa y apreciar la reducción del porcentaje que supone la *side population* tras la incubación con RES en la mayoría de casos.

En el caso de la muestra de LCP la *side population* supuso un 49,8% de la población de CPs CD138<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>, que se redujo a un 3,4% tras incubación con RES.

### 3.1.2. Expresión de genes de células madre en las células *side population* de MM

Se estudió mediante NGS la expresión del transcriptoma de células *side population* y se comparó con las células de la NSP de 3 muestras de pacientes en diferentes estadios de la enfermedad (GMSI, MM sintomático y LCP) y 2 líneas celulares (L-363 y OPM-2). Mediante el uso de la herramienta Gene Ontology (GO) se pudo detectar los grupos de genes que se encontraban sobreexpresados según sus relaciones funcionales en las células de la *side population* respecto a las células NSP. De este modo se evaluó si las células de la *side population* podrían constituir las células madre tumorales de MM o si presentan potencial clonogénico, constituyendo las células iniciadoras de tumor, para poder dar lugar a toda la masa tumoral.

En la muestra de células de la *side population* de GMSI se detectaron 2 genes, cuya sobreexpresión era estadísticamente significativa, implicados en la regulación negativa de la diferenciación de células madre (GO ID 2000737) con un p valor de 0,0378 y en el mantenimiento de células madre somáticas (GO ID 35019) con un p valor de 0,046. Además, se encontraron 6 genes implicados en metilación y, concretamente, 3 implicados en metilación de histonas (GO ID 51568, 34968, 16571). Se detectaron otros 11 genes implicados en el mantenimiento, regulación de la proliferación y de la diferenciación de células madre, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. También se detectaron 26 genes implicados en proliferación celular sobreexpresados ( $p < 0,05$ ) frente a células NSP. Cabe destacar que se encontraron sobreexpresados 11 genes implicados en adhesión celular, 13 en migración y 23 genes implicados en la activación, proliferación, migración y agregación de leucocitos. Como curiosidad, las células *side population* sobreexpresaban 2 genes implicados en la regulación de la quimiotaxis de células NK con un p valor de 0,0071 y 0,00348 (GO ID 2000501 y 2000503 respectivamente).

En las células de *side population* de MM se detectó la expresión de 11 genes del grupo de procesos biológicos implicados en el metabolismo de células madre, pero sólo se encontró sobreexpresado, respecto a células de la NSP, 1 gen implicado en el mantenimiento de células madre (GO ID 19827). Entre los genes sobreexpresados se detectaron también 7 genes implicados en proliferación celular, 10 genes implicados en

adhesión celular, 11 en migración, y sólo 8 genes sobreexpresados implicados en activación, proliferación, migración y agregación de leucocitos. En estas células también se detectó sobreexpresión de los 2 genes involucrados en la regulación de la quimiotaxis de las células NK anteriormente señalados ( $p=0,036$  para 2000501 y  $0,026$  para 2000503).

En cambio, en la muestra de células de *side population* de LCP de los 11 genes implicados en el metabolismo de células madre cuya expresión se detectó se encontró que 6 de ellos mostraban una sobreexpresión estadísticamente significativa en procesos directamente relacionados con el mantenimiento y la proliferación de células madre. Se apreció una expresión diferencial de 6 genes implicados en división celular, 6 genes en proliferación celular, 22 genes en activación, proliferación, migración y agregación de leucocitos. Se observó además la presencia de 15 genes sobreexpresados relacionados con adhesión celular con respecto a células NSP y 14 genes involucrados en migración celular. Los genes involucrados en promoción de la quimiotaxis de células NK se encontraban sobreexpresados GO ID 35747 ( $p=0,024$ ) y 2000503 ( $p=0,039$ ). Además, se detectaron sobreexpresados con una significación elevada genes implicados en favorecer la actividad de células NK (tabla 12).

GO ID	Función en términos GO (dentro de procesos biológicos)	P valor
2717	Regulación positiva de la inmunidad mediada por células NK	0,0005
2715	Regulación de la inmunidad mediada por células NK	0,0016
45954	Regulación positiva de la citotoxicidad mediada por células NK	0,009
42269	Regulación de la citotoxicidad mediada por células NK	0,0215
2228	Inmunidad mediada por células NK	0,012

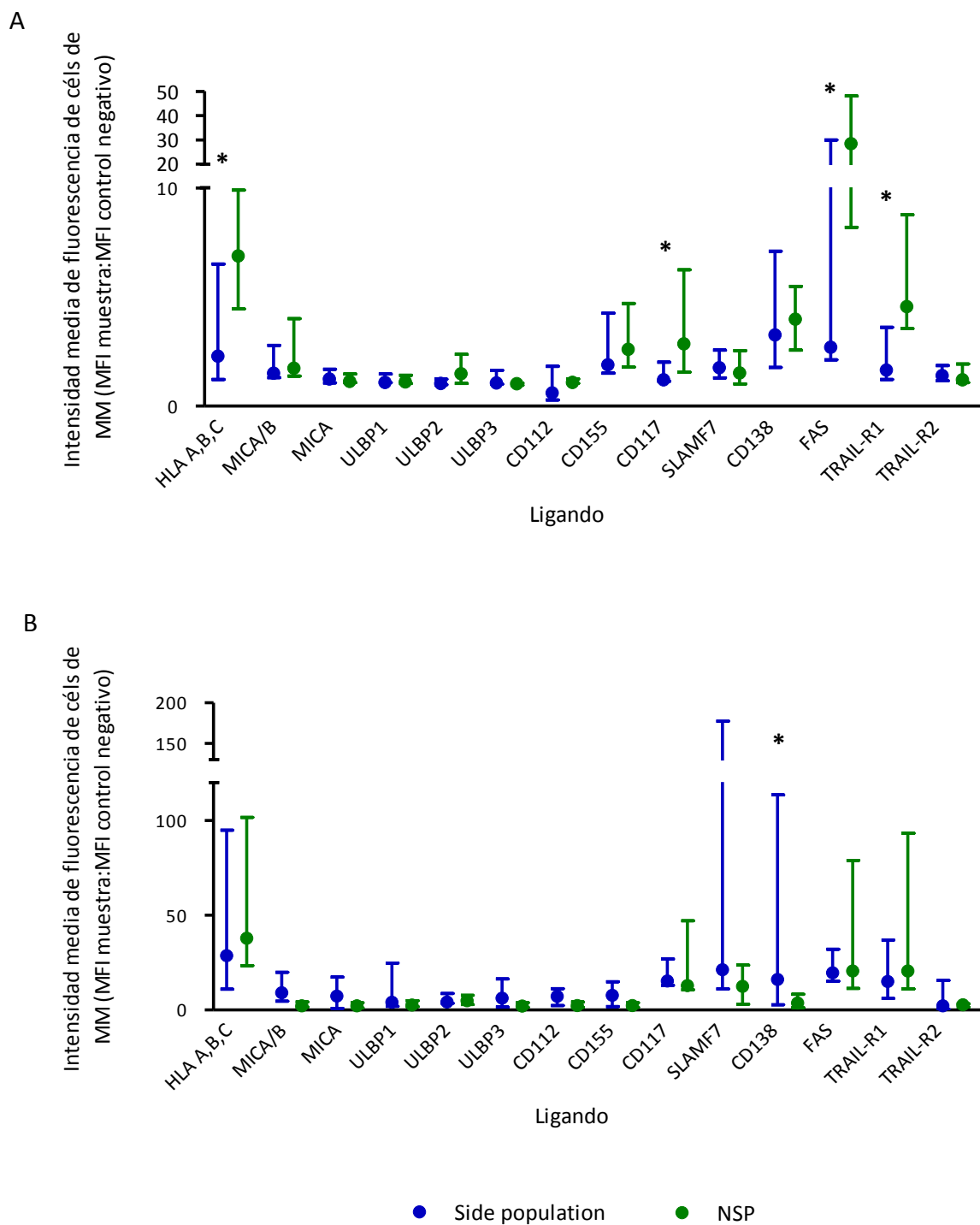
**Tabla 12. Representación de los genes sobreexpresados en células *side population*.** Listado de los genes implicados en la actividad de las células NK que se encuentran sobreexpresados en las células *side population*. Para ello, se detalla el número de identificación otorgado por GO, la descripción de la función de cada gen y el valor de p obtenido frente a células NSP.

En la línea celular OPM-2 se hallaron sobreexpresados los mismos 6 genes implicados en el metabolismo de células madre que en LCP. Además, se encontraron sobreexpresados 15 genes implicados en división celular. Sólo 4 genes involucrados en procesos de adhesión celular y 2 involucrados en migración se encontraron sobreexpresados respecto a células NSP. Se encontraron 10 genes sobreexpresados implicados en activación, proliferación, migración y agregación de leucocitos.

En la línea L-363, pese a que se detectó la expresión de 24 genes involucrados en el metabolismo de células madre, ninguno de ellos mostró sobreexpresión respecto a las células NSP. Sí que se detectó en las células *side population* sobreexpresión de genes involucrados en división y proliferación celular (14 y 2 respectivamente).

### 3.1.3. Expresión de ligandos de células NK en células de la *side population*

Se estudió el perfil de expresión de ligandos de células NK en células *side population* mediante citometría de flujo para evaluar si las células de la *side population* podían constituir potenciales dianas terapéuticas en la terapia con células NKA-E, y se confirmaron los resultados obtenidos mediante secuenciación masiva. Las células de *side population* de líneas celulares de MM analizadas (n=8) por CMF mostraron una infraexpresión de los receptores implicados en apoptosis celular, Fas (también denominado CD95) y TRAIL-R1 (o DR4), que resultó ser estadísticamente significativa ( $p=0,012$  y  $0,024$  para Fas y TRAIL-R1 respectivamente). Se observó a su vez infraexpresión de CD117 (c-kit) en *side population* ( $p=0,012$ ) y de HLA-A, B, C ( $P=0,012$ ). Los ligandos de NKG2D, MICA, MICB, ULBP1, ULBP2 y ULBP3 no mostraron diferencias entre *side population* y NSP. Lo mismo ocurrió con los ligandos de DNAM-1, CD112 (nectina-2) y CD155 (PVR). Tampoco se apreció que las células de la *side population* mostraran baja expresión de CD138 (figura 27 A).



**Figura 27. Caracterización de *side population* en MM.** Gráfica comparativa de la expresión de ligandos de receptores de células (cél)s NK en células de *side population* y células NSP de **(A)** líneas celulares de MM y de **(B)** muestras de MO procedentes de pacientes con MM por citometría de flujo. Los datos representan la intensidad media de fluorescencia para cada ligando analizado en cada una de las dos poblaciones (se normalizaron los datos obtenidos para cada línea celular en función del control negativo correspondiente) de un mínimo de 8 experimentos independientes en el caso de líneas celulares y 5 experimentos independientes en el caso de células de pacientes. \*  $p < 0,05$  con respecto a células NSP.

En el caso de muestras procedentes de pacientes con MM (n=5) no se observaron las mismas diferencias que en líneas celulares. Sólo se observaron diferencias significativas en la expresión de CD138 que, curiosamente, poseía mayor expresión en células de la *side population* (p=0,043) que en células NSP. Se mantuvo la expresión tanto de los ligandos de NKG2D (MICA, MICB, ULBP1, ULBP2 y ULBP3) como de los de DNAM-1 (CD112 y CD155) sin diferencias significativas entre *side population* y NSP (figura 27 B). Tampoco se apreciaron diferencias en la expresión de HLA A, B, C, CD117, SLAMF7, ni en ninguno de los receptores de apoptosis. En conclusión, no se detectó ninguna diferencia cuantitativa en el fenotipo de membrana de ligandos de células NK entre células de MM *side population* y NSP.

Los resultados de CMF fueron confirmados mediante RNA-seq. Se corroboraron las diferencias de expresión obtenidas para CD138 (sindecano-1) en las muestras de pacientes (MM y LCP). Todos ellos mostraron una significación muy elevada presentando unos valores de *false discovery rate* (FDR) inferiores a 0,00187. Para este tipo de estudios se usó como estadístico de referencia el FDR en detrimento de p porque posee mayor precisión estadística para estudios con un elevado volumen de datos. Se confirmaron también las diferencias observadas en la expresión de HLA A, B y C en las dos líneas celulares (L-363 y OPM-2). En este caso, mediante NGS se observaron diferencias entre la expresión de HLA-B para OPM-2 y HLA-C para L-363 que podrían contribuir a las diferencias globales observadas por CMF para HLA-A, B y C en líneas celulares. En muestras primarias sólo se apreciaron diferencias en HLA-B para la muestra de LCP, pero no en MM.

La expresión de los ligandos de NKG2D (MICA, MICB, ULBP1, ULBP2 y ULBP3) fue detectada sobre todo en las muestras primarias de MM y LCP y en ninguno de los dos casos se obtuvieron diferencias significativas en la expresión entre *side population* y NSP (FDR>0,999). En el caso de las líneas celulares, al haberse analizado por RNA-seq sólo 2 de las 8 líneas analizadas por CMF, no se pueden generalizar los datos obtenidos a todas las líneas. La expresión de los ligandos de NKG2D sólo se detectó en las células OPM-2 y no todos los ligandos, aún así tampoco se hallaron diferencias entre *side population* y

NSP. La expresión de los ligandos de DNAM-1 (CD112 [PVRL2] y CD155 [PVR]) sólo fue detectada en la muestra de MM y en la línea L-363. No se vieron diferencias entre *side population* y NSP.

Las diferencias de expresión de los receptores implicados en apoptosis celular (Fas, TRAIL-DR4 y TRAIL-DR5) que mostraban infraexpresión por CMF, así como las de CD117 (c-kit) no pudieron confirmarse por NGS en líneas celulares. Como era de esperar por los resultados obtenidos por CMF, en muestras de pacientes (MM y LCP) no se observaron diferencias de expresión entre *side population* y NSP.

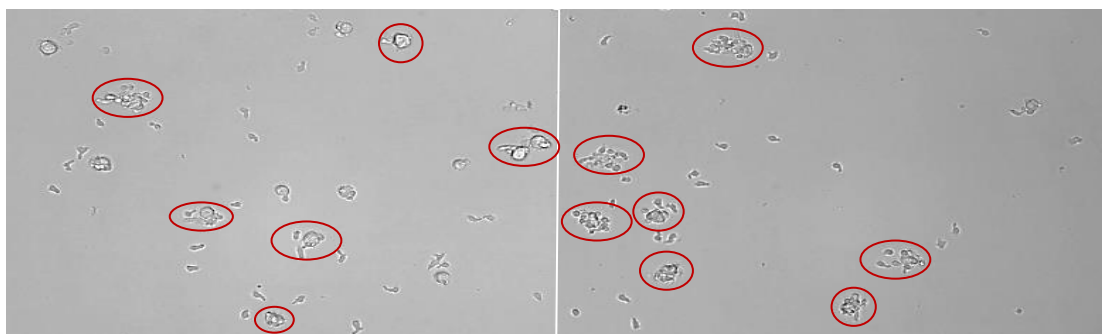
SLAMF7 no mostró diferencias en muestras de pacientes, en cambio, sí que mostró diferencias en las dos líneas celulares (FDR=0,043 y 0,041 para OPM-2 y L-363 respectivamente), lo que se contradice con los datos obtenidos por CMF. Se debe tener en cuenta que los estudios realizados por NGS sólo se han realizado con una muestra de MM y de LCP pese a que los datos de CMF se han realizado con mayor volumen de muestras y únicamente de MM. Sería necesario mayor tamaño muestral por NGS para confirmar con mayor fiabilidad los resultados.

No se encontraron diferencias significativas en la expresión del ligando de Nkp30, B7H6 (o NCR3LG1), que no pudo ser detectado por CMF, entre la *side population* de las dos líneas celulares L-363 y OPM-2 y de la muestra de MM y la NSP. En todos los casos el valor del FDR fue superior a 0,7.

### 3.2. Identificación y destrucción de las células de la *side population* por parte de las células NKA

Mediante microscopía *in vivo*, se estudió la actividad citotóxica de células NKA frente a la línea celular de MM RPMI-8226, que ya había sido previamente utilizada para este tipo de experimentos. Se comparó la actividad citotóxica de células NKA frente a células tumorales totales de MM RPMI-8226 con la actividad de estas mismas NKAs frente a células de *side population* de la misma línea tumoral (ver video ANEXO IV). Las células de *side population* fueron purificadas mediante separación celular por *sorting*.

A



B

	Contactos		Necrosis/Apoptosis de células de MM	
NKAE vs células de MM	27	29	3	1
	29	31	4	2
NKAEs vs <i>side population</i>	36	27	3	3
	38	41	1	3

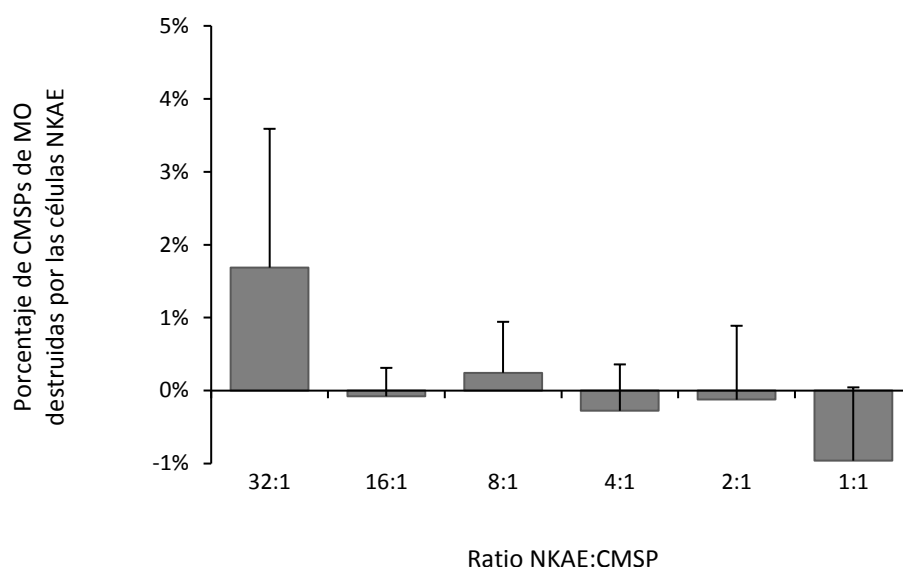
**Figura 28. Actividad de las células NKAE *in vivo* frente a células *side population* de MM.** (A) Imagen representativa del estudio de microscopía *in vivo* realizado. Se resaltan las células NKAE adheridas (círculo rojo) al lecho de células de MM (izquierda) o de *side population* (derecha) pudiendo observarse los cúmulos de células NKAE entorno a las células de MM del lecho. (B) Se cuantificó el número de contactos entre células NKAE y células de MM o células *side population* durante los 20 minutos que duró el flujo (contactos) para, posteriormente, cuantificar el número de células de MM que entraron en necrosis o en apoptosis tras el contacto con NKAEs (Necrosis/Apoptosis de células de MM). Se muestran los valores obtenidos en cada uno de los cuatro cuadrantes analizados para demostrar la representatividad del proceso.



Como ya se ha descrito anteriormente, se observó que las células NKAЕ podían abandonar con facilidad el flujo de medio de cultivo en el que se encontraban para llegar al lecho monocapa de células de MM (figura 28 A, izquierda) o el lecho de células *side population* (figura 28 A, derecha). En los dos casos, se apreció que las células NKAЕ eran capaces de establecer múltiples contactos efectivos con las células tumorales ya fuesen células tumorales totales o células *side population* (figura 28 B) sin apreciarse diferencias significativas entre unos y otros ( $p=0,083$ ). Asimismo, se observó que en los dos casos (analizando cuatro campos para cada una de las dos condiciones experimentales) las células de MM, tanto células totales como *side population*, entraban en apoptosis/necrosis para, finalmente, perder las uniones al lecho establecido y ser arrastradas por el flujo. Tampoco se observaron diferencias significativas ( $p=1$ ) en el número de células destruidas por las células NKAЕ.

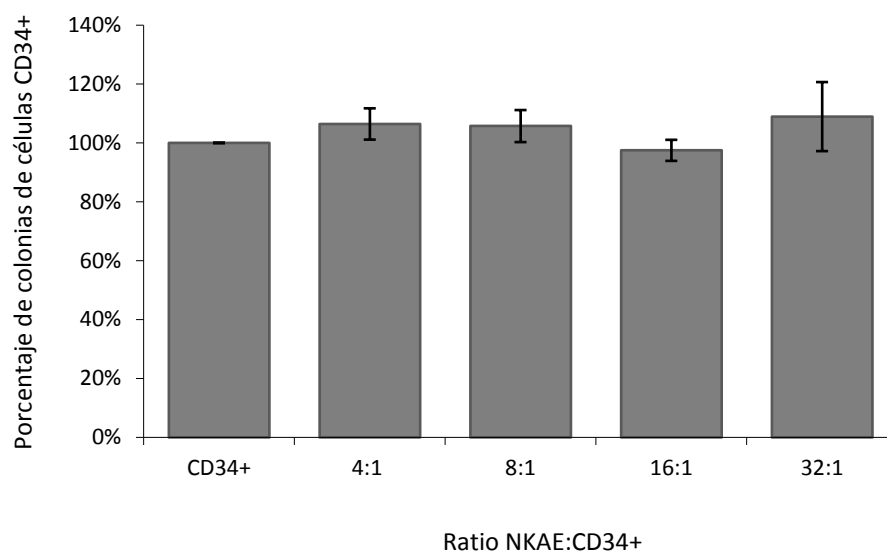
### 3.3. Seguridad de las células NKAЕ frente a la célula madre hematopoyética sana CD34<sup>+</sup>

Se evaluó la seguridad de las células NKAЕ obtenidas *in vitro*. Para ello, se analizó si las NKAЕs destruían células sanas procedentes de MO de pacientes. Se aislaron las células mononucleares de MO y se enfrentaron a células NKAЕ. Se observó que, tras dos horas de exposición, las células NKAЕ no destruían las células mononucleares procedentes de MO sana. Solamente se observó una citotoxicidad máxima de  $1,7\% \pm 1,9\%$ , que se produjo a la concentración máxima de células NKAЕ (32:1). Para el resto de ratios utilizadas, la citotoxicidad siempre tuvo un valor cercano a 0, en algunos casos el valor observado fue negativo debido, seguramente, a la variabilidad entre las muestras utilizadas: -0,08%, 0,24%, -0,28%, -0,12% y -0,96% para las ratios 16:1, 8:1, 4:1, 2:1 y 1:1 respectivamente (figura 29). En ningún caso se observaron diferencias significativas debidas a la concentración de células NKAЕ utilizada, ni siquiera con la concentración máxima ( $p=0,114$ ).



**Figura 29. Las células NKA son seguras frente a CMSPs procedentes de MO sana.** Se evaluó la actividad citotóxica de células NKA frente a CMSPs procedentes de MO sana. Los datos representan la media  $\pm$  DE de un mínimo de 4 experimentos independientes para cada ratio utilizado y se expresan como el porcentaje de CMSPs de MO sana destruidas por las células NKA.

Se estudió también el efecto sobre la célula progenitora hematopoyética CD34<sup>+</sup>. Se aislaron las células CD34<sup>+</sup> de MO mediante separación celular por *sorting* para, posteriormente, enfrentarlas a las células NKA y observar el crecimiento de colonias formadas a partir de progenitores hematopoyéticos en metilcelulosa. Se pudo observar que no había ninguna diferencia significativa ( $p=0,236$ ) en el número de colonias crecidas en metilcelulosa al compararlas con el crecimiento de colonias procedentes de células CD34<sup>+</sup> que no habían sido expuestas previamente a células NKA. Frente a todas las concentraciones de NKA utilizadas el porcentaje de colonias observado permaneció prácticamente invariable (rango: 97,5% - 108,96%), no observándose ninguna actividad citotóxica sobre las células CD34<sup>+</sup> ni ningún efecto relacionado con la concentración (figura 30).

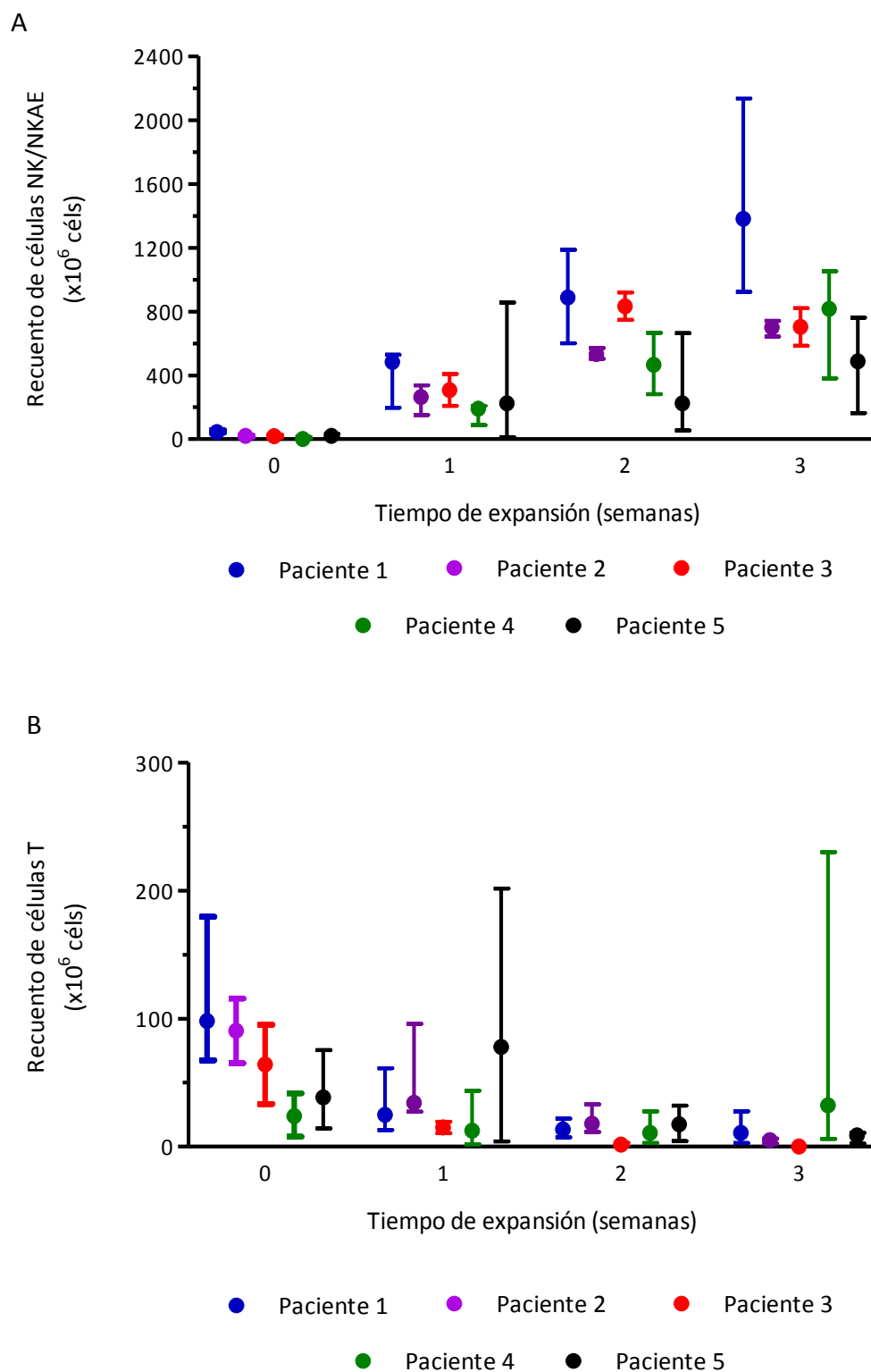


**Figura 30. Las células NKA son seguras frente a progenitores hematopoyéticos procedentes de MO sana.** Los resultados representan la media  $\pm$  DE de un mínimo de 3 experimentos independientes para cada muestra de NKA y se expresan como el porcentaje de colonias procedentes de células CD34<sup>+</sup> crecidas en comparación con el crecimiento autónomo en metilcelulosa de células CD34<sup>+</sup>.

#### 4. USO CLÍNICO DE CÉLULAS NKAЕ: ENSAYO CLÍNICO NK-VS-MM

##### 4.1. Producción de células NKAЕ a gran escala para su uso clínico

Se generaron 18 productos NKAЕ en condiciones GMP para ser infundidos. Los cinco pacientes incluidos en el ensayo clínico recibieron un total de 36 infusiones de células NKAЕ (2 por producto generado): ocho infusiones por paciente en cuatro de los cinco pacientes, y cuatro infusiones en una paciente debido a una complicación no relacionada con la terapia en estudio. Se obtuvo un número de células NK de  $20,82 \cdot 10^6$  (rango:  $3,6 \cdot 10^6$  -  $47 \cdot 10^6$ ) partiendo de 200 ml de SP por paciente, sin necesidad de aféresis. Esta cantidad representó el 17,4% (rango: 6,5% - 23,6%) del total de células CMSP (figura 31 A). Tras una semana de expansión, el número de NKAЕs  $CD56^+CD3^-$  alcanzó  $277,53 \cdot 10^6$  (rango:  $162,6$  -  $403,81 \cdot 10^6$ ) multiplicando el número inicial de células NKAЕ por 13. Después de la segunda semana de expansión, el número de células NKAЕ sufrió un incremento de 30 veces la cantidad inicial alcanzando un valor de  $626,8 \cdot 10^6$  NKAЕs (rango:  $314,6$  -  $919,25 \cdot 10^6$ ). En el día 14 se recogieron del cultivo  $550 \cdot 10^6$  ( $\pm 50 \cdot 10^6$ ) NKAЕs para la primera infusión de cada ciclo y se dejaron creciendo en cultivo  $281 \cdot 10^6$  NKAЕs (rango:  $153$  -  $439 \cdot 10^6$ ) para la siguiente infusión del ciclo. Finalmente, tras 21 días de cultivo, el número de células NKAЕ fue de  $942,6 \cdot 10^6$  (rango:  $470,8$  -  $1480,8 \cdot 10^6$ ). En ese momento las células NKAЕ sufrieron un incremento de 45 veces por encima del valor inicial. La pureza en el momento de la recogida de las células NKAЕ para infusión en la tercera semana fue del 90% (rango: 80,1% - 99,2%). En todos los casos la pureza siempre fue superior al 75%, salvo para una paciente que necesitó dos procesos de expansión en el segundo ciclo de tratamiento para poder alcanzar los requisitos de pureza exigidos. En general, el porcentaje de viabilidad fue de 92,28% (rango: 40,05% - 99,05%).

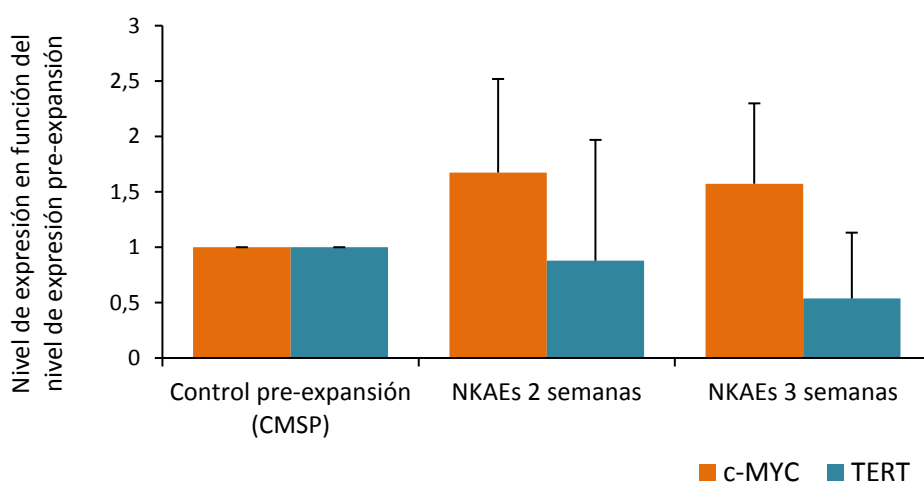


**Figura 31. Obtención de células NKAE para uso clínico.** Representación gráfica del proceso de expansión de células NK **(A)** y de la evolución de las células T durante la expansión **(B)**. Los datos representan la mediana con el rango intercuartil (IQR) de 4 experimentos independientes para cada uno de los 5 pacientes incluidos en el ensayo y se representan como el número de células presente en cada semana de expansión.

Al igual que en los procesos de expansión realizados *in vitro*, no fue necesario recurrir a la depleción de linfocitos T ya que los productos utilizados fueron autólogos y se cultivaron en condiciones de baja concentración de IL-2. Aún así, se analizaron los valores de linfocitos T presentes en cultivo. Inicialmente, los linfocitos T presentes representaban el 52% de las CMSPs recolectadas (rango: 44,6% - 66,3%) pero este porcentaje disminuyó drásticamente hasta 4% (range: 0,0% - 11,6%) en el momento de la recolección para su infusión tras 21 días de cultivo (figura 31 B).

#### 4.2. Seguridad las células NKAe *in vitro* e *in vivo*

Se estudió la seguridad de las células NKAe mediante el análisis de los niveles de expresión de c-Myc y de TERT en las NKAe generadas *in vitro*. No se apreciaron variaciones significativas de los niveles de expresión, aunque se observó que en dos de los pacientes se produjo un aumento de los niveles de ARN tanto de c-Myc como de TERT hasta el doble del nivel basal durante la segunda semana de expansión (figura 32). Este aumento revirtió al nivel del control pre-expansión tras la tercera semana de expansión. Cabe destacar que ningún paciente tuvo ninguna complicación ni desarrolló ningún tipo de neoplasia secundaria al tratamiento con células NKAe, con un seguimiento de los enfermos aún vivos de más de 36 meses (n=2).



**Figura 32. Niveles de expresión de c-Myc y TERT en las células NKAe.** Las células NKAe no mostraron potencial oncogénico. Los resultados representan la media  $\pm$  DE de muestras de cuatro pacientes incluidos en el ensayo clínico.

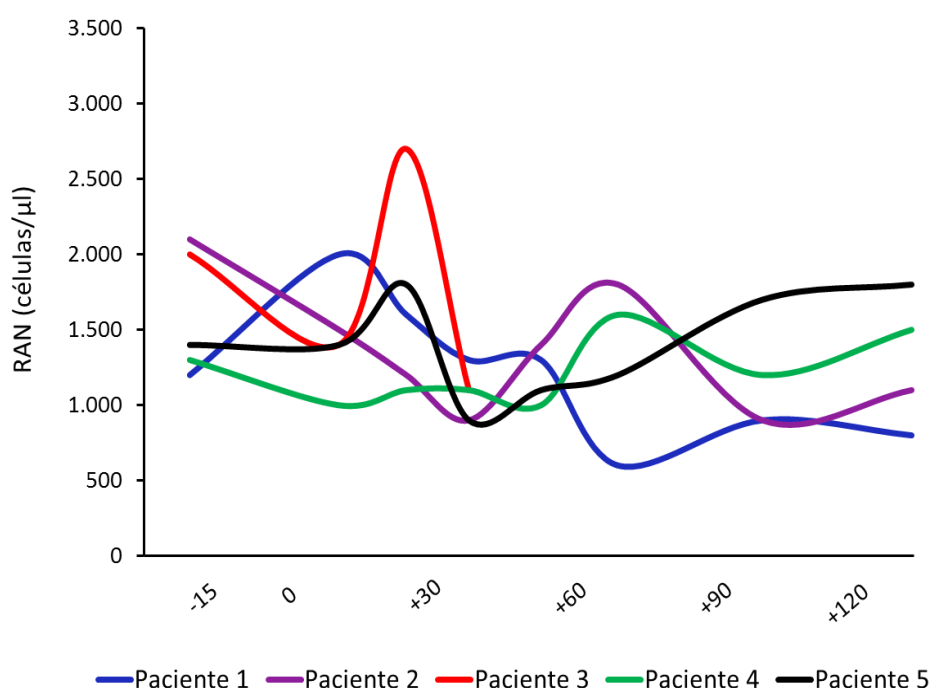
Asimismo, para demostrar la ausencia de la línea celular K562-mb15-41BBL, se evaluaron los niveles de expresión de BCR-ABL en los cultivos de NKAes antes de iniciar el tratamiento con NKAes, a día 7 de expansión, día 14, día 21 y al finalizar el tratamiento en CMSPs de los pacientes. La expresión de BCR-ABL fue prácticamente indetectable tras la primera semana de expansión (datos no mostrados) y tampoco fue detectada en muestras de CMSPs de los pacientes incluidos en el ensayo una vez finalizada la terapia con células NKAe. Estos resultados indican que la línea celular fue erradicada de los cultivos por completo antes de la infusión (tabla 13).

	Porcentaje de expresión de BCR-ABL
CMSPs de pretratamiento	Indetectable
NKAes día 14	1.36% $\pm$ 1.47%
NKAes día 21	0.64% $\pm$ 1.2%
CMSPs de paciente postratamiento	Indetectable

**Tabla 13. Niveles de expresión de BCR-ABL en las células NKAe.** Las células NKAe no mostraron restos de la línea celular K562-mb15-41BBL. Los resultados representan la media  $\pm$  DE de muestras de cuatro pacientes incluidos en el ensayo clínico.

Una vez analizada y confirmada la ausencia de potencial oncogénico de las células NKAe *in vitro*, se estudió el efecto *in vivo* en los pacientes incluidos en el ensayo NK-VS-MM. Se realizó un seguimiento de la evolución de los parámetros de bioquímica y hemograma estudiados en las analíticas para evaluar la posible toxicidad de la terapia con NKAes, prestando especial atención a los valores de hemoglobina, hematíes, plaquetas, leucocitos y neutrófilos, cuya variación podría reflejar la existencia de toxicidad hematológica. Ninguno de los cinco pacientes mostró señales de toxicidad orgánica, no se vio alterado ningún parámetro de la bioquímica ni durante el tratamiento con NKAes ni durante el periodo de seguimiento posterior de un año de

duración. Sólo se observó un leve grado de toxicidad hematológica. Dos de los pacientes del ensayo (pacientes 1 y 2) mostraron una moderada neutropenia de grado II-III (entre 1500 y 1000/ $\mu$ l - menos de 1000/ $\mu$ l) durante el tratamiento con NKAEs. Aunque todos los pacientes mostraron neutropenia grado II en algún momento del estudio como consecuencia de la quimioterapia recibida (LEN o BOR), sólo los pacientes 1 y 2 la desarrollaron tras iniciar el tratamiento con NKAEs y no la mostraban en el momento de iniciar el tratamiento mientras que los pacientes 2, 4 y 5 ya la presentaban en el día 0 del estudio como se puede apreciar en la figura 33. Por este motivo se subraya la existencia de neutropenia en estos dos pacientes, aunque podría no deberse al tratamiento con NKAEs ya que también recibieron tratamiento antineoplásico y podrían haber desarrollado neutropenia secundaria al tratamiento farmacológico y no a la terapia celular recibida. Aún así, la neutropenia no se agravó en ningún momento ni los pacientes necesitaron ajuste de dosis.



**Figura 33. Evolución de los niveles de neutrófilos en SP.** Se monitorizó el recuento absoluto de neutrófilos (RAN) en SP en cada uno de los 5 pacientes del ensayo clínico durante los 4 meses de duración del tratamiento con células NKAEs.



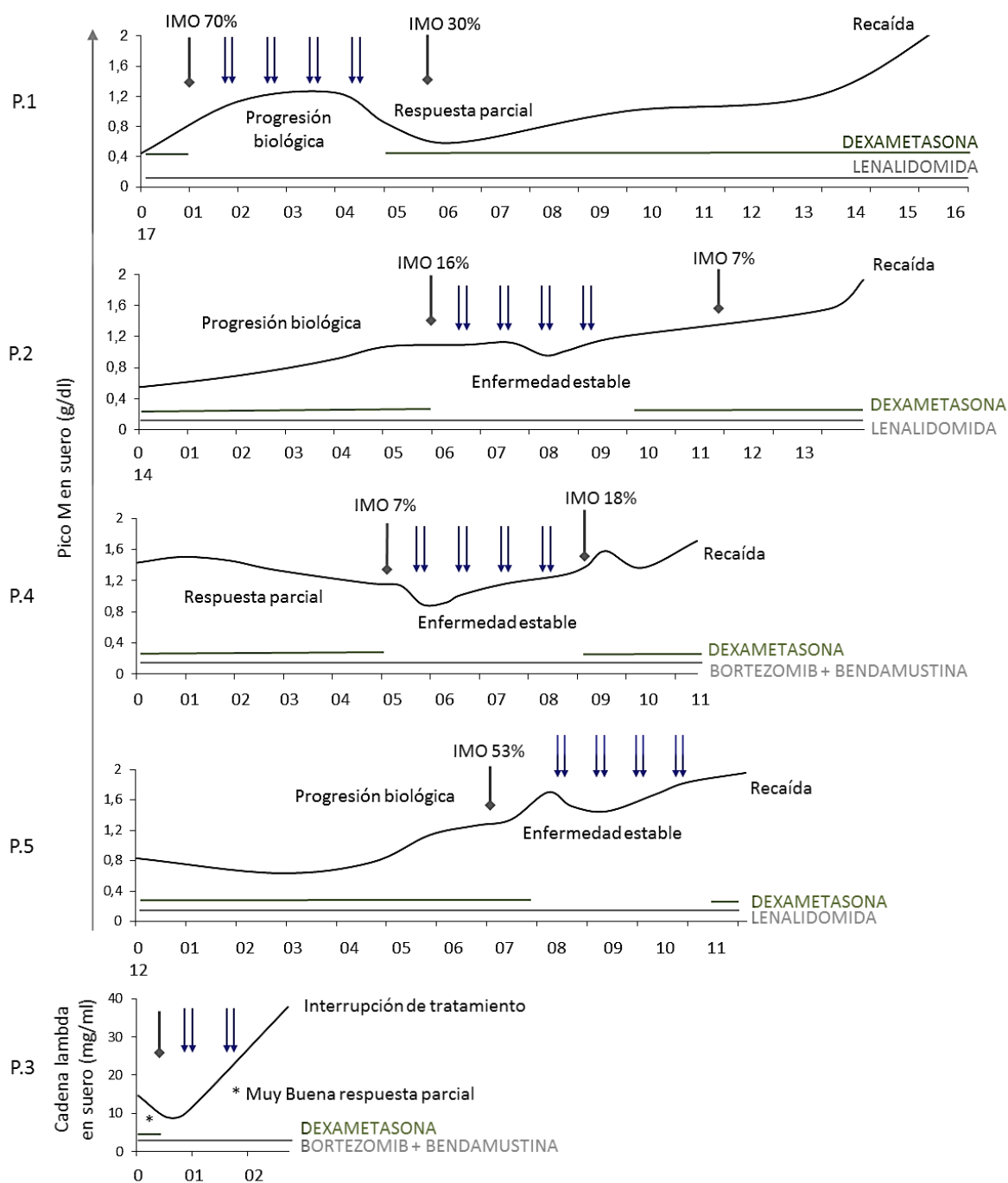
La paciente 3 abandonó el ensayo de manera prematura debido a una hemorragia digestiva de repetición no relacionada con el tratamiento con células NKAE. Esto supuso la interrupción de la terapia durante un tiempo prolongado pudiendo afectar a la efectividad de la terapia por lo que la paciente fue excluida para evitar sesgos en los resultados.

#### 4.3. Eficacia de la administración de dosis repetidas de células NKAE

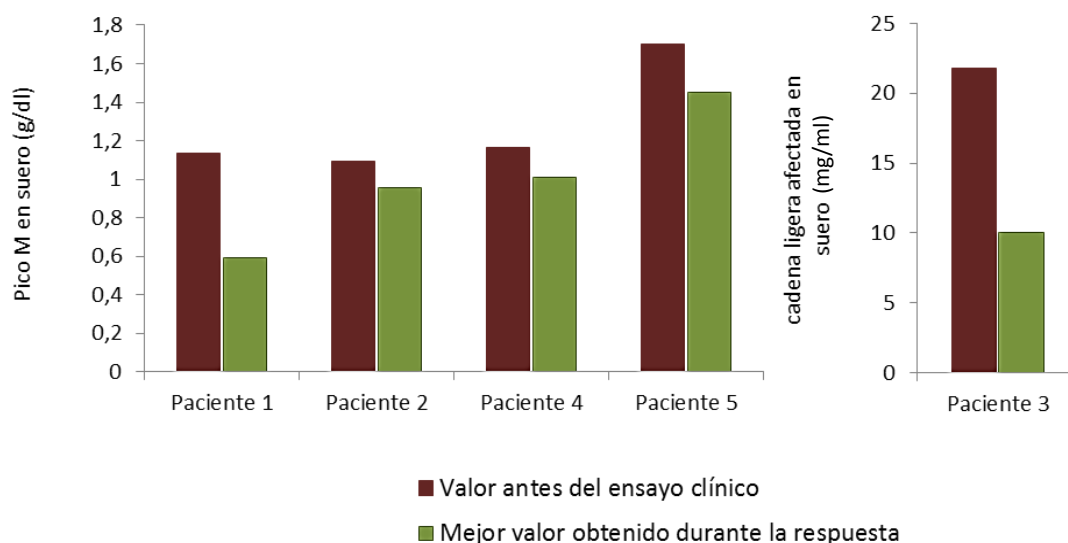
Para monitorizar la evolución de la enfermedad se analizaron los niveles de proteína M (g/dl) en los pacientes del ensayo clínico durante toda la terapia con células NKAE y durante el seguimiento hasta la siguiente recaída. El paciente 1 fue incluido en el ensayo encontrándose en progresión asintomática. Se detectó una infiltración en MO (IMO) de 70% tras 40 ciclos de tratamiento con LEN. Al finalizar la terapia con NKAEs el paciente alcanzó respuesta parcial y la IMO se redujo a 30% (figura 34). Asimismo, el pico M disminuyó a casi la mitad desde 1,13 g/dl hasta 0,59 g/dl (figura 35). El paciente mantuvo la respuesta durante 13 meses sin más tratamiento que LEN + dexametasona, el mismo tratamiento recibido antes de la terapia con NKAEs.

La paciente 2 se encontraba en recaída tras 12 ciclos de tratamiento con LEN cuando fue incluida en el ensayo. Tras la terapia con NKAEs alcanzó enfermedad estable y la mantuvo durante 9 meses hasta la progresión de la enfermedad sin necesidad de tratamiento durante 15 meses tras la terapia celular (figura 34). Se objetivó una reducción de la IMO del 9% (de 16% a 7%) tras el tratamiento, y el pico M se mantuvo estable entre 1,09 y 0,96 g/dl (figura 35).

En el caso de la paciente 3, ésta se encontraba en muy buena respuesta parcial tras 14 ciclos de tratamiento con BOR + BEN antes de su inclusión. Tuvo que ser monitorizada mediante seguimiento de la evolución de la cadena ligera  $\lambda$  en suero (figura 34). Durante el primer ciclo de tratamiento con NKAEs los niveles de cadena  $\lambda$  disminuyeron de 21,8 mg/ml a 10 mg/ml (figura 35). Como ya se ha descrito, presentó progresión de la enfermedad 2 meses después de interrumpir el tratamiento con NKAEs.



**Figura 34. Evolución de la respuesta de los pacientes con MM al tratamiento con células NKA.** Se monitorizó la evolución del pico M de los 5 pacientes del ensayo NK-VS-MM durante la terapia con NKAes y durante toda la duración de la respuesta hasta la recaída. Se representó también la evolución de la enfermedad en los ciclos previos al tratamiento si ésta se consideró relevante para la interpretación de la respuesta. El momento de cada una de las 8 infusiones con NKAes se representa con el símbolo ↓ y el de la extracción de MO para analizar la IMO mediante el símbolo ⬇.



**Figura 35. Evolución del pico M en los pacientes del ensayo NK-VS-MM.** Se analizó la concentración de proteína monoclonal en suero (g/dl) de los 5 pacientes del ensayo (cadena ligera para la paciente 3). En las gráficas se representa el valor de concentración de pico M de cada paciente una vez incluido en el ensayo clínico, pero previamente al inicio del tratamiento con NKAes (granate) y el valor mínimo de pico M obtenido durante la respuesta al tratamiento con NKAes (verde).

El paciente 4 alcanzó respuesta parcial tras 5 ciclos de tratamiento con BOR + BEN mostró una IMO de 7%. Tras la terapia con NKAes alcanzó EE continuando únicamente con el tratamiento inicial y la mantuvo durante 3 meses (figura 34). El pico M se mantuvo estable entre 1,17 a 1,01 g/dl (figura 35). Pese a que el análisis por citología mostró que la IMO aumentó a 18% al finalizar el tratamiento, los resultados por CMF no corroboraron este hallazgo.

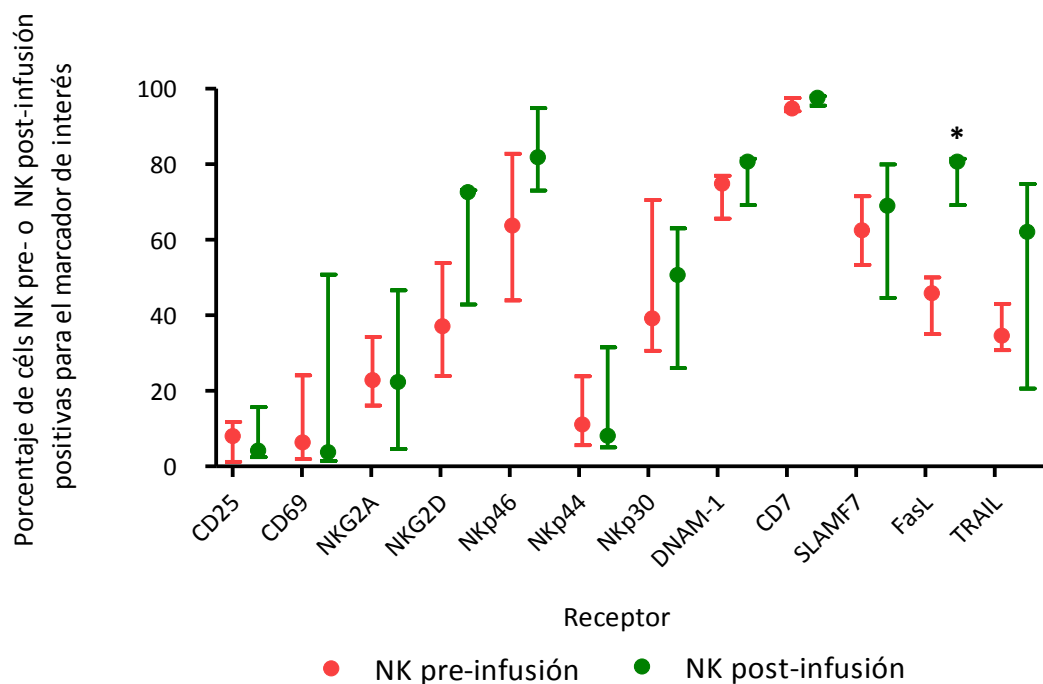
La paciente 5 que se encontraba en progresión asintomática tras 9 ciclos de tratamiento con LEN y que presentaba una IMO de 53%, mostró una estabilización de la enfermedad tras el tratamiento con NKAes (figura 34). Mantuvo la respuesta durante 2 meses más sólo con tratamiento con LEN y el pico M se redujo 0,25 g/dl (de 1,7 a 1,45 g/dl) como se observa en la figura 35.

#### 4.4. Detección de las células NKAE tras infusión

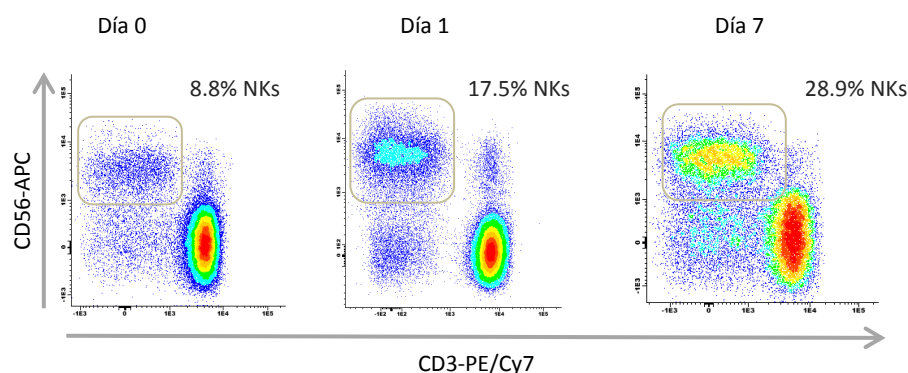
Se analizó el fenotipo de membrana de células NK en muestras de CMSPs de los pacientes del estudio antes de ser incluidos en él y tras infusión de células NKAE, para poder evaluar si la presencia de estas células puede detectarse en SP tras infusión. Aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas, salvo para el ligando de apoptosis FasL ( $p=0,043$ ) cuya expresión fue superior en células NK de CMSPs tras la infusión, si que se pudo apreciar una tendencia a presentar una mayor expresión de receptores de citotoxicidad y ligandos de apoptosis (figura 36 A). Los receptores NKG2D, NKp46, NKp30, DNAM-1 y TRAIL, mostraron mayor expresión en NKs post-infusión pese a que se observó que la variabilidad en los resultados fue mayor que en las muestras de CMSPs pre-infusión seguramente debido a que el tamaño muestral fue sólo de 5 pacientes.

Pese a que estos hallazgos pudieran no ser del todo concluyentes, el análisis del porcentaje de células NK presente en CMSPs a lo largo del ciclo de tratamiento también evidenció un aumento del porcentaje relativo de células NK en SP con respecto al resto de linfocitos tras infusión, tal y como se puede observar en la figura 36 B. Se detectó un mayor porcentaje de células NK una semana después de la primera infusión, justo antes de la segunda infusión. El porcentaje de células NK presentes en CMSPs en el momento de inclusión en el estudio fue de 21,5% (rango: 8,8% - 32%) mientras que 7 días tras la primera infusión este porcentaje se incrementó hasta 25,3% (rango: 23,5% - 27,1%). Sólo 1 de los 5 pacientes mostró un porcentaje de NKs inferior el séptimo día que al inicio del estudio. Aún así, en todos los casos, este aumento del porcentaje se correlacionó con un aumento en el recuento absoluto de células NK a los 7 días de infusión. Los pacientes mostraron un recuento absoluto (mediana) de células NK de 99,4 NKs/ $\mu$ l (rango: 61,6 – 384 NKs/ $\mu$ l) al inicio del estudio y 188 NKs/ $\mu$ l (rango: 74,7 – 406,5 NKs/ $\mu$ l) 7 días después previamente a la segunda infusión del ciclo. Estos resultados demuestran la persistencia de las células NKAE infundidas en SP sin necesidad de ningún estímulo extrínseco.

A

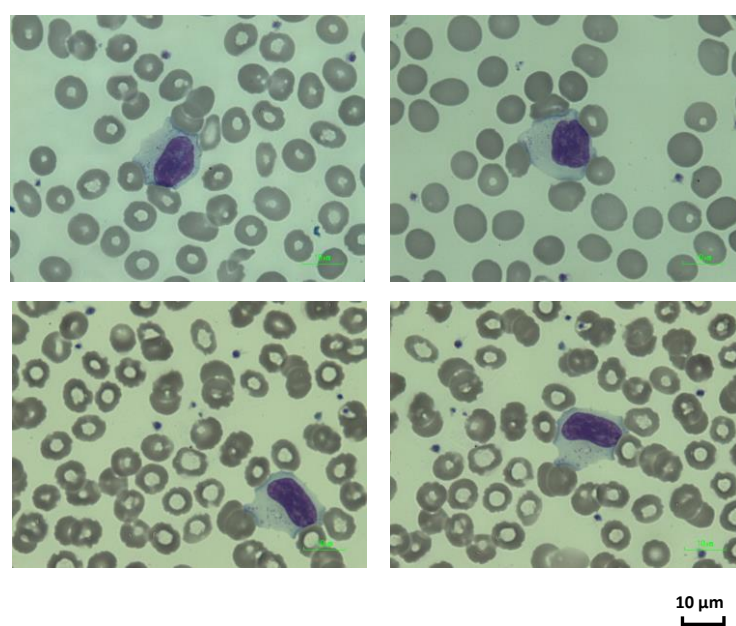


B



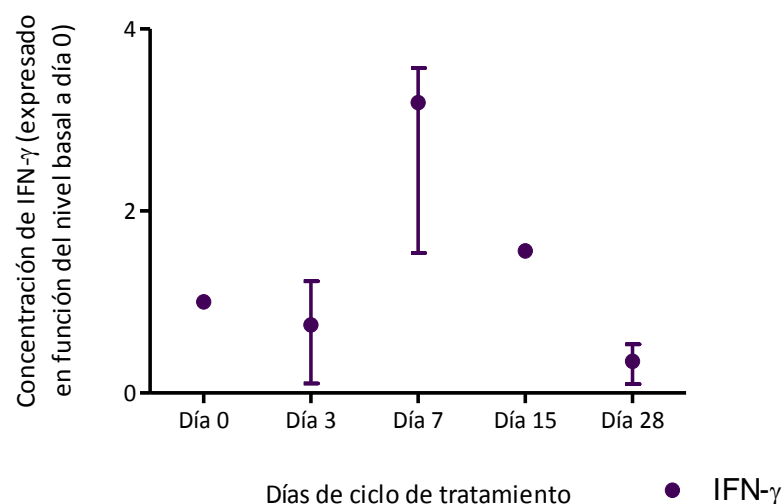
**Figura 36. La presencia de NKAes en SP puede evidenciarse tras la infusión. (A)** Mediante CMF se analizó el porcentaje de células (cél) NK positivas para cada marcador de interés en CMSPs antes de la primera infusión y después de la infusión. Los datos representan la mediana con IQR de 5 experimentos independientes tanto para NKs pre-infusión como post-infusión. \* $p < 0,05$  respecto a NKs pre-infusión. **(B)** Se muestran diagramas de puntos representativos del aumento del porcentaje de células NK CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> durante el ciclo de tratamiento de un paciente a día 0, día 1 y día 7.

Se realizaron también extensiones de SP para observar mediante tinción citológica de Wright la presencia de linfocitos grandes granulares activados que corresponderían a células NK. La examinación de las preparaciones reveló la presencia de  $3,2 \pm 2$  al inicio del estudio y un aumento estadísticamente significativo de 2,6 veces ( $p < 0,05$ ) justo tras la infusión ( $8,5 \pm 3$ ). El aumento se matuvo 1 hora después de la infusión con un recuento de  $7,7 \pm 3,7$  (figura 37). Un día después de la infusión aún se podía detectar un aumento de 2,01 veces el valor inicial de linfocitos obtenido ( $6,7 \pm 3$ ).



**Figura 37. Presencia de linfocitos grandes granulares en SP tras infusión de células NKAЕ.** Imágenes de microscopía óptica en campo claro 100X que muestran la presencia de linfocitos grandes granulares (aspecto que tienen los linfocitos activados) en la SP de los pacientes incluidos en el ensayo NK-VS-MM tras la infusión de células NKAЕ. Se puede observar el característico núcleo de gran tamaño de los linfocitos teñido intensamente.

Adicionalmente, se monitorizaron los niveles de citoquinas proinflamatorias circulantes en el suero (mediante *Cytokine Bead Array*) de los 5 pacientes del ensayo a día 0 (previamente a la infusión) y a días 3, 7, 15 y 28 post-infusión. Se observó un aumento de la concentración de IFN- $\gamma$  durante los primeros 7 días de tratamiento con células NKA-E desde 2,47 pg/ml (rango: 0 – 3,25 pg/ml) hasta un máximo de 3,2 pg/ml (rango: 2,34 – 8,82 pg/ml). A partir de ese momento se apreció una disminución de los niveles de IFN- $\gamma$  que, a día 28, alcanzaron valores inferiores a los detectados al inicio del estudio 0,58 pg/ml (rango: 0 – 1,34 pg/ml), como se puede apreciar en la figura 38. Dado que el intervalo de toma de muestras no fue homogéneo y que sólo se obtuvo muestra de un paciente a día 15 (por lo que el dato no es representativo de lo que ocurre en ese punto), podría haberse producido un mayor aumento de los niveles de IFN- $\gamma$  entre los días 7 y 28 que podría no haber sido detectado. Debido a esto se puede apreciar que el aumento de la concentración de IFN- $\gamma$  es relativamente drástico (día 0 a día 7) mientras que la reducción de los niveles es más progresiva (día 7 a día 28). El resto de citoquinas analizadas (IL-2, IL-4, IL-6, TNF y IL-17A) no mostraron ningún patrón de expresión característico relacionado con el ciclo de tratamiento con NKA-Es.



**Figura 38. Evolución de los niveles de IFN- $\gamma$  en suero durante el tratamiento con células NKA-E.** Gráfica representativa de las concentraciones de IFN- $\gamma$  en suero, los datos representan la mediana junto con IQR de 5 experimentos independientes para cada día (0, 3, 7 y 28) del ciclo, salvo para el día 15 de ciclo (un dato).

#### 4.5. Efecto del tratamiento farmacológico sobre las NKAes infundidas

Como ya se ha descrito anteriormente 3 de los pacientes incluidos (pacientes 1, 2 y 5) se encontraban bajo tratamiento antineoplásico con LEN mientras que los otros 2 pacientes (pacientes 3 y 4) recibieron tratamiento con BOR. No se detectaron diferencias en los procesos de expansión *ex vivo* de células NK debido al tratamiento anti-mieloma que los pacientes estuviesen recibiendo en ese momento (figura 39 A). La capacidad proliferativa de las células NK fue la misma para las muestras procedentes de pacientes tratados con LEN que para pacientes tratados con BOR. Sí se apreció que en todos los pacientes se produjo un incremento *in vivo* del porcentaje de células NK en SP, pero esa expansión *in vivo* fue superior en los pacientes que recibían tratamiento con BOR (figura 39 B). Éstos presentaban un porcentaje de células NK del 15,15% antes del tratamiento con NKAes (rango: 8,8% - 21,5%). Siete días después, aumentó hasta 26,9% (rango: 24,9% - 28,9%) antes de la siguiente infusión del ciclo. En cambio, los pacientes tratados con LEN sólo mostraron un incremento de 0,43% en 7 días, desde 24,86% (rango: 17,22% - 32%) hasta 25,29% (rango: 23,5% - 27,1%).

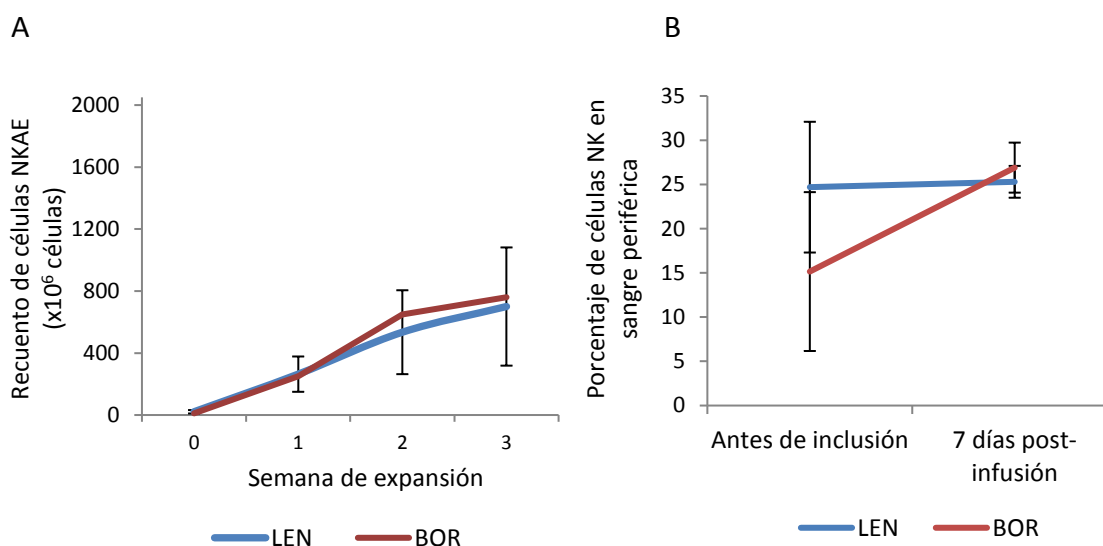
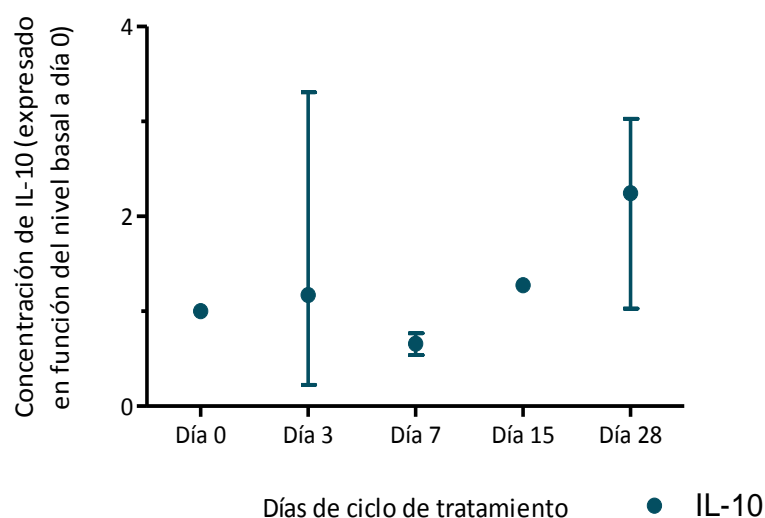


Figura 39. **Efecto del tratamiento farmacológico sobre las células NKAes.** (A) Recuento de células NKAes durante el proceso de expansión *ex vivo* de pacientes bajo tratamiento con LEN (pacientes 1, 2 y 5) de los cuales se realizaron 12 procesos de expansión, y de los pacientes bajo tratamiento con BOR (pacientes 3 y 4) de los cuales se realizaron 6 procesos de expansión. (B) Expansión *in vivo* de células NK, expresado como porcentaje de células NK en sangre periférica, de pacientes bajo tratamiento con LEN (pacientes 1, 2 y 5) o bajo tratamiento con BOR (pacientes 3 y 4). Los resultados representan la media  $\pm$  desviación estándar.



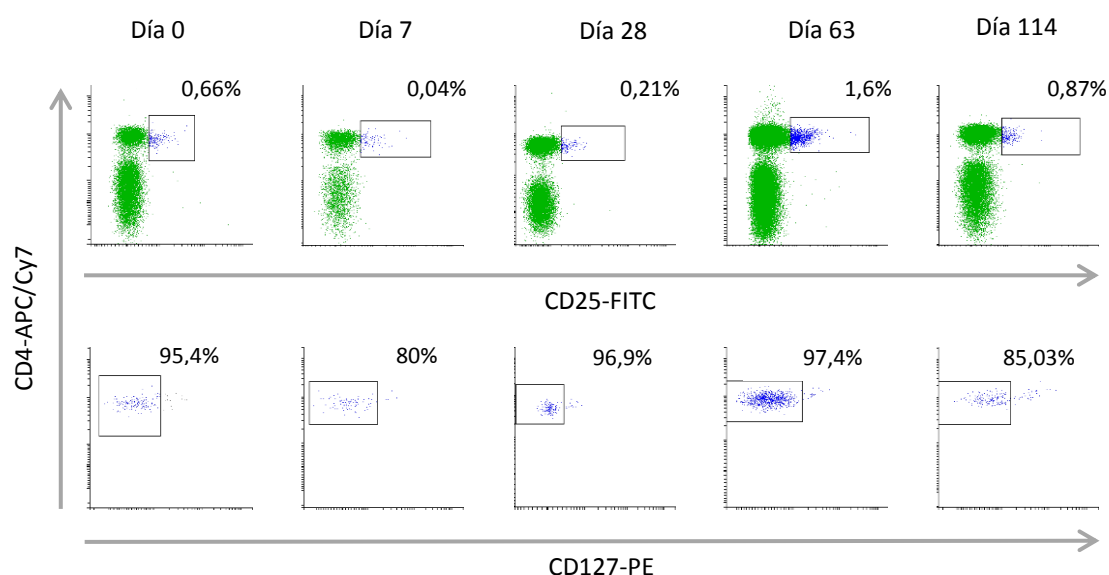
#### 4.6. Detección de mecanismos de regulación negativa

Al contrario que el resto de citoquinas, sí que se detectaron cambios relevantes en los niveles de la citoquina antiinflamatoria IL-10, en los sueros de los pacientes del ensayo clínico. Cabe destacar que las variaciones en la concentración de IL-10 se encontraban inversamente relacionadas con las detectadas en IFN- $\gamma$ . Se observó que la concentración de IL-10 inicial de 1,31 pg/ml (rango: 0,69 – 8,1 pg/ml) se mantuvo estable y disminuyó ligeramente hasta una concentración de 1,1 pg/ml (rango: 0,53 – 4,36 pg/ml) a día 7 (figura 40) para prácticamente duplicarse a día 28 de ciclo con un valor de 2,36 pg/ml (rango: 1,67 – 3,75 pg/ml). Al igual que en el caso del IFN- $\gamma$ , las variaciones que pudieran haberse producido en los niveles de IL-10 entre los días 7 y 28 podrían no haber sido detectadas.



**Figura 40. Evolución de los niveles de IL-10 en suero durante el tratamiento con células NKAE.** Gráfica representativa de las concentraciones de IL-10 en suero, los datos representan la mediana junto con IQR de 5 experimentos independientes para cada día (0, 3, 7 y 28) del ciclo, salvo para el día 15 de ciclo (un dato).

Finalmente, se analizaron mediante CMF los porcentajes de linfocitos Treg  $CD4^+CD25^+CD127^-$  presentes en la SP de los pacientes del ensayo para poder descartar la presencia y proliferación de mecanismos reguladores que pudieran afectar negativamente la acción citotóxica de las células NKAЕ infundidas (figura 41). No se detectaron cambios significativos en los porcentajes de los linfocitos Treg (relativos a los linfocitos  $CD3^+$ ) durante los 4 ciclos de infusión de células NKAЕ. Los linfocitos Treg supusieron solamente un 0,63% de los linfocitos  $CD3^+$  al inicio del estudio y un 0,74% al finalizar el estudio (día 114, fin del último ciclo de tratamiento). Asimismo, tampoco se detectó ningún aumento en los porcentajes de linfocitos  $CD3^+$ .



**Figura 41. Evolución de los linfocitos Treg durante el ensayo NK-VS-MM.** Se monitorizaron los porcentajes de linfocitos Treg  $CD4^+CD25^+CD127^-$  en SP durante todo el ensayo clínico. Para ello, se muestran diagramas de puntos representativos de la estrategia de análisis utilizada por CMF y de la presencia de estos Tregs en cada punto temporal del ensayo. Inicialmente se determinó el porcentaje de linfocitos  $CD3^+$  que también era doble positivo para CD4 y CD25 (diagramas superiores). Posteriormente, en una segunda fase de análisis, se determinó el porcentaje de esos linfocitos  $CD4^+CD25^+$  que tenían baja o nula expresión de CD127 (gráficas inferiores).



// Discusión



## **Los pacientes con MM poseen una disfunción en sus células NK y ésta afecta a la destrucción de la célula tumoral clonogénica**

Actualmente, el origen del MM es una de las incógnitas que aún se encuentran sin resolver (Smith and Yong, 2016), múltiples grupos de investigación avanzan en la búsqueda de una potencial cura (Barlogie et al., 2014). Mientras se sigue indagando en la obtención de una cura, uno de los factores que parece tener gran importancia en el desarrollo inicial de la enfermedad y en su progresión es la desregulación del sistema inmune (Pratt et al., 2007) tanto en la inmunidad celular como humoral lo que favorece la aparición de un microambiente inmunosupresor (Rosenblatt and Avigan, 2015). Además de ocurrir en condiciones patológicas, también se ha demostrado que el sistema inmune se encuentra deteriorado en personas de edad avanzada, momento más susceptible y habitual para el desarrollo del MM (Hayhoe et al., 2010).

El sistema inmune posee por tanto una función esencial en el control de la proliferación de células sometidas a estrés, aberrantes o tumorales (Vivier et al., 2008). Los resultados aquí presentados demuestran que las células NK de pacientes con MM poseen una capacidad citotóxica disminuida en comparación con la que poseen las células NK de donantes sanos. Esto implicaría una peor defensa frente a organismos patógenos y una inmunovigilancia menos eficaz en condiciones fisiológicas que podría pasar por alto la aparición de estas células aberrantes y que permitiría así la instauración y el desarrollo de la enfermedad. Además, los pacientes sometidos a tratamiento antineoplásico sufren a su vez una merma en su sistema inmune debido a la agresividad de los fármacos empleados (Donnelly et al., 2014, Morrison, 2014, Stevens et al., 2016). Nuestros estudios van en consonancia con los estudios de otros autores que muestran esta disminución de actividad en las células NK de pacientes con MM. Así, el análisis retrospectivo realizado por Sébastien Viel y su grupo mostró que, aunque en varios estudios realizados los pacientes con MM presentaban porcentajes elevados de células NK en SP, los pacientes con mayores porcentajes eran los de peor prognosis (Viel et al., 2013) debido seguramente a un intento del organismo para contener la proliferación de células de MM. En nuestros estudios se analizó el porcentaje de células NK presente en

SP y los pacientes mostraron porcentajes equivalentes en la mayoría de las veces a los de donantes sanos pero la actividad siempre fue inferior.

Diversos estudios evidenciaron también la capacidad de células NK procedentes de líneas celulares para destruir las células de MM (Swift et al., 2012) así como células de otras patologías como cáncer de colon (Kim et al., 2015). La actividad de líneas de células NK no es equiparable a la de células NK primarias procedentes de pacientes y que no hayan sido inmortalizadas *in vitro*. Las líneas celulares de NK proceden en la mayoría de casos de leucemias o linfomas de células NK con un elevado número de mutaciones y poseen una actividad citotóxica elevada en comparación con células NK primarias (Suck et al., 2016).

En nuestros resultados se muestra la variabilidad debida a la exposición a diferentes líneas celulares de MM, todas ellas procedentes de pacientes con MM. Las células NK no destruyen por igual las diferentes líneas de MM (Heidenreich et al., 2012, Fionda et al., 2015a, Abruzzese et al., 2016). Como hemos podido comprobar, en algunos casos hay una diferencia de citotoxicidad de más del 20% entre las diferentes líneas de MM. Este hecho podría ser representativo de las diferencias observadas entre pacientes y al estadio de evolución de la enfermedad en cada uno de ellos. Numerosos estudios han demostrado ampliamente que el estadio de la enfermedad se correlaciona con una peor actividad de las células NK en pacientes con MM (Garcia-Sanz et al., 1996, Carbone et al., 2005), lo que justifica aún más el desarrollo de una posible terapia celular con células NKs para pacientes con MM.

Sin embargo, nuestros estudios pueden no acabar de reflejar completamente la actividad de las células NK *in vivo* dado que no hemos estudiado esta actividad frente a células primarias de MM procedentes de MO. Las líneas celulares de MM podrían haber acumulado mutaciones que las hiciesen aún más resistentes a la actividad citotóxica de las NKs promoviendo mecanismos de inmunoescape que *in vivo* no se hubiesen desarrollado. La obtención de células primarias de MM para nuestros estudios de citotoxicidad permitió extraer números muy bajos de células plasmáticas de MM que resultaron insuficientes para el tipo de estudios que realizamos. Pese a ello, diversos estudios han demostrado que las células NK de pacientes son también capaces de

destruir células autólogas de MM (Soriani et al., 2009, Katodritou et al., 2011, Fionda et al., 2015b).

La mayoría de estudios presentan experimentos en los que se exponían las células NK a células plasmáticas de MM durante 4 horas mediante experimentos con cromó, y en muchos de los casos la exposición se hacía frente a células K562. Este tipo celular carece de alelos HLA por lo que la detección y destrucción por parte de las células NK se ve favorecida ya que las células NK tienen capacidad para detectar las células que carecen de HLA (Parham, 2005, Parham, 2015). Las células K562 pueden ser muy útiles para los estudios relacionados con leucemia mieloide en los que esta línea puede resultar representativa de la enfermedad (Holubova et al., 2016, Shabrish et al., 2016) pero no para MM, dado que en resultados, que se discutirán posteriormente, se ha detectado que éste sobreexpresa receptores HLA en membrana. En cambio, nuestros estudios muestran sólo una exposición de 2 horas de duración y siempre frente a células plasmáticas de MM, lo que reflejaría de manera más realista el efecto inicial de la exposición a NKs en el contexto del MM. Además, nuestro estudio compara en todo momento la actividad de las células NK de MM con la de las células de donantes sanos, la única forma de establecer de manera manifiesta la disfunción de las células NK de pacientes.

Nuestros estudios funcionales de citotoxicidad en suspensión se ven además completados por los estudios funcionales en cultivos semi-sólidos en metilcelulosa. Estos estudios reflejarían la habilidad de las células NK para destruir la célula tumoral clonogénica capaz de proliferar y de dar una progenie celular formando así un clon (Jones et al., 1987, Williams et al., 2010). En el MM, es sabido que no todas las células tumorales que conforman el grueso de la carga tumoral poseen capacidad clonogénica (Hamburger and Salmon, 1977a) y que sólo una pequeña parte es responsable de la resistencia del MM a los diferentes tratamientos existentes (Matsui et al., 2004, Faussner and Dempke, 2012, Kumar et al., 2012, Tanno et al., 2014). En cultivo semi-sólido se ha podido comprobar la deficiencia funcional existente en las células NK. Por lo tanto, las células NK de pacientes con MM no sólo no son capaces de destruir las células plasmáticas de MM de manera eficaz, en comparación con las células NK de donantes sanos, si no que esta deficiencia afecta directamente a su capacidad de



destrucción de la célula tumoral clonogénica de MM responsable de la resistencia y progresión de la enfermedad. También se pudieron observar diferencias en función de la línea celular de MM utilizada, lo que también podría ser representativo de las diferencias entre pacientes según la agresividad de la enfermedad. Pese a que frente a algunas líneas (como la OPM-2) las células NK de pacientes sí que podían destruir del mismo modo que las células de donantes las células clonogénicas tumorales, frente a otras (como la L-363) no fue así.

El estudio del efecto de las células NK sobre la célula tumoral clonogénica no está tan desarrollado. Actualmente, todos los esfuerzos se enfocan en analizar la acción de los fármacos sobre las células tumorales totales y, por otro lado, en caracterizar la célula madre de MM. Al no haber un consenso a día de hoy en la caracterización de las células madre de MM (Pascutti et al., 2013), no hay una evaluación fiable del efecto de algunos tratamientos sobre la célula madre (se desarrollará este aspecto posteriormente en el cuarto apartado). Lo que sí se puede evaluar es la presencia de las células con potencial clonogénico en el MM (sin determinar su pluripotencialidad) y por ello ver el efecto de las NKs sobre éstas es crucial.

### **Las células NK de pacientes con MM pueden activarse, recuperan la actividad citotóxica y destruyen la célula tumoral clonogénica de MM**

Hemos establecido la necesidad de potenciar el sistema inmune de los pacientes con MM en respuesta a la deficiencia inmunitaria encontrada en el organismo de estos últimos. Actualmente, son muchas las estrategias evaluadas para este propósito; la activación de linfocitos T cuya abundancia y potente actividad los haría adecuados para este fin (Hinrichs and Rosenberg, 2014), la activación de células dendríticas que poseen las moléculas coestimuladoras, de adhesión y HLA necesarias para desencadenar una respuesta (Yi et al., 2010, Hong et al., 2012) o la activación de células NK. En comparación con otros linajes celulares, las células NK presentan ciertas ventajas a la hora de ser utilizadas como terapia. Pese a existir un porcentaje mayor de linfocitos T en SP en

comparación con el porcentaje de células NK, éstas poseen capacidad de destrucción de células aberrantes sin necesidad de contacto previo ni detección de antígenos específicos, requiriendo por lo tanto un tiempo de reacción mucho más corto que los linfocitos T. Además, las células NK liberan citoquinas proinflamatorias que promueven la activación tanto de linfocitos T como de células dendríticas (Smyth et al., 2002). Asimismo, las células NK comprenden un 15% de los linfocitos circulantes (Cooper et al., 2001, Almeida-Oliveira et al., 2011), suficiente como para poder expandirlas *in vitro* tal y como se deduce de los resultados aquí obtenidos. Partiendo de cantidades realmente pequeñas de células NK se puede obtener varios cientos de millones de células NK.

Aunque la utilización de células NK procedentes de CMSPs requiere varios pasos de manipulación, sobre todo a la hora de preparar la línea celular utilizada como cebador, permite utilizar células NK de pacientes con MM pudiendo evitar así el uso de células de donantes sanos o de líneas celulares de NK. Diversos autores defienden la utilización de líneas celulares, como la NK-92, NKG, YT, TALL104 o KHYG-1, por la sencillez en su manipulación y crecimiento, y, en algunos casos, por su capacidad citotóxica. Aunque sólo la NK-92 ha mostrado resultados robustos para avanzar hacia estudios clínicos (Klingemann, 2015). Uno de los primeros problemas que se presentan a la hora de plantearse utilizar líneas celulares es su procedencia. Como ya hemos mencionado anteriormente las líneas celulares de NKs provienen de muestras de leucemias o linfomas de células NK. Además, muchas de ellas no cumplen estrictamente la condición de célula NK ya que algunas no expresan CD56 (como la YT) y otras coexpresan CD56 y CD3 siendo más similares a líneas celulares T (como la TALL104). Las líneas celulares necesitan ser irradiadas, al igual que las líneas utilizadas como cebador para expansión (Klingemann et al., 2016) por lo que su utilización conlleva una manipulación equivalente a la expansión mediante el uso de líneas cebadoras. Además, en el caso de las NK-92 y KHYG-1, al comparar su actividad con la obtenida en células NKAe los resultados son similares frente a líneas de MM utilizadas en nuestros estudios, una citotoxicidad entre un 20% y un 65% en función de la línea de MM a una ratio 40:1. De hecho, en nuestros estudios *in vitro* la citotoxicidad de las NKAes nunca fue inferior al 40% para una ratio 32:1. Además mediante microscopía *in vivo* se observó que las células NKAe poseían mayor capacidad de adhesión, movilidad y detección que las

células de paciente. Al igual que fue descrito para NKAes procedentes de donantes sanos (Garg et al., 2012), una única célula NKAe procedente de paciente posee capacidad para contactar y destruir más de una célula tumoral de MM.

La citotoxicidad de las NKAes frente a la célula tumoral clonogénica también ha resultado ser equivalente y hasta superior a la obtenida por el grupo del Dr. Keating con las NK-92 o KHYG-1 frente a la línea RPMI-8226, siendo del 90% a una ratio 4:1 y prácticamente del 100% desde una ratio 16:1 (Swift et al., 2012). Nuestros datos muestran que el uso de células NKAe presenta las mismas ventajas que el uso de líneas NK. Es más, nuestro estudio es de los pocos estudios que demuestra el efecto de las NKAes y de las células NK en general sobre la célula tumoral clonogénica o iniciadora de tumor. Como ya se ha mencionado con anterioridad, el estudio de la actividad citotóxica de las células NK sobre las células clonogénicas se encuentra poco desarrollado y, pese a existir multitud de estudios relativos a la actividad citotóxica frente a células tumorales, pocos de ellos, como los del grupo del Dr. Keating, estudian el efecto sobre la célula tumoral clonogénica o la célula iniciadora de tumor.

Los primeros métodos de activación de células NK realizaban la activación mediante adición en cultivo de cócteles de citoquinas como IL-2, IL-15 e IL-18 (Qi et al., 2016) y, actualmente, se sigue utilizando por ser uno de los métodos más económicos. No obstante, este método no se encuentra exento de manipulación, requiere uno o varios pasos previos de depleción de los linfocitos T, para evitar la proliferación de éstos durante el cultivo. Pese a producir células NK altamente citotóxicas en algunos casos, esta metodología no produce un aumento en el número de células NK tan notable como el método descrito en nuestro estudio y, por lo tanto, permite una única infusión de células NK. Además supone la adición constante de IL-2, entre otras citoquinas, incluso *in vivo* con la toxicidad y riesgos que ello conlleva debido a la abundancia de efectos pleiotrópicos que posee (Skrombolas and Frelinger, 2014). La corta vida media de la IL-2 en suero (Shaker and Younes, 2009) requiere la administración de elevadas dosis para alcanzar concentraciones terapéuticas lo que puede producir una liberación de citoquinas conocida como “tormenta de citoquinas” debido a la sobreestimulación del sistema inmune. La utilización de dosis bajas para limitar efectos adversos suele también limitar el efecto clínico (Yang et al., 2003a). Además, uno de los efectos colaterales de la

utilización de IL-2, incluso a dosis bajas, es la estimulación de los linfocitos Treg (Koreth et al., 2011, Matsuoka et al., 2013, Koreth et al., 2016) que inhiben la actividad del sistema inmune, concretamente de las células NK (Smyth et al., 2006, Ralainirina et al., 2007). En nuestros estudios únicamente se utiliza 100 UI/ml de IL-2 en cultivo y es eliminada previamente a la infusión mediante lavado.

Otros métodos que no requieren el uso de líneas cebadoras, como la coestimulación con anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD52, requieren pasos previos como purificación mediante *sorting* que ponen en peligro la esterilidad de la muestra, concentraciones 5 veces superior de IL-2 (lo que puede favorecer la proliferación de linfocitos T) y, pese a mostrar eficacia *in vitro* frente a carcinoma pancreático, la eficacia frente a células linfoides Jurkat fue prácticamente nula, inferior al 20% a una ratio de 20:1 (Masuyama et al., 2016).

Diversos estudios muestran que la expansión mediante líneas cebadoras es la que obtiene mayores números de células NK (Klingemann, 2013). En nuestro caso, los resultados muestran que la expansión en condiciones GMP obtiene una mayor multiplicación de las células NK comparada con los estudios *in vitro* no GMP. Seguramente esto pueda deberse al número de células de partida, ya que *in vitro* partimos de  $10 \cdot 10^6$  células NK y *ex vivo* en condiciones GMP se partió de  $20 \cdot 10^6$  células NK.

La expansión con otros métodos similares, como el uso de la línea EBV-LCL requiere la purificación de células NK mediante separación inmunomagnética y elevadas cantidades de la línea EBV-LCL, mostrando un efecto relevante en la expansión a una ratio excesivamente elevada de 20:1 (Berg et al., 2009). Pese a ello, la citotoxicidad de sus NKs no fue superior al 27%. Markus Granzin presentó resultados de expansión mediante este método. Obtuvo una expansión de células NK de 23 veces en la primera semana en contraposición con el aumento de 13 veces en nuestro estudio en condiciones GMP. Al finalizar el cultivo, la expansión obtenida con esta línea producía un aumento de 53 veces en la segunda semana pero sólo mediante adición de IL-21 en sus cultivos (Granzin et al., 2016). En nuestro estudio se obtuvo un valor similar (un aumento de 45 veces) en la tercera semana de expansión, sin necesidad de añadir más

citoquinas que la IL-2. Obteniendo valores similares, los estudios de Granzin mostraron que las células NK obtenidas no podían mantenerse en cultivo más allá de las dos semanas sin reestimulación con la línea cebadora. El método empleado en nuestro estudio permite mantener los cultivos 3 semanas sin pérdida de eficacia y sin reestimulación (Lapteva et al., 2012, Lapteva et al., 2014), lo que supone una ventaja a la hora de aplicarlo a la clínica para poder obtener más de una dosis de un mismo cultivo. Asimismo, evita la adición de más componentes al cultivo y requiere menos pasos previos de preparación ya que en ningún caso fue necesario deplecionar los linfocitos T.

Cabe destacar que la mayoría de los estudios analizados muestran resultados de expansión de células NK procedentes de donantes sanos. Nuestros estudios, realizados siempre con células de pacientes con MM muestran resultados equiparables a los de donantes sanos. Estos hallazgos sustentan la posibilidad de realizar terapia *in vivo* con células autólogas sin la necesidad de usar células alogénicas.

La expansión de células NK mediante el empleo de la línea K562-mb15-41BBL ha mostrado un efecto robusto tanto en la producción de células NK como en la activación de éstas. No obstante, ciertos aspectos podrían ser una pieza clave a la hora de perfeccionar esta técnica. La adición de IL-21 a los cultivos muestra un efecto considerable en la expansión y en la actividad citotóxica de las células NK (Davis et al., 2015) por lo que el empleo de una línea cebadora transducida con IL-21 podría estimular en mayor medida la proliferación y citotoxicidad de las NKs (Denman et al., 2012, Oyer et al., 2016). Otro abordaje complementario podría implicar el empleo de biorreactores ya que han mostrado ser una buena estrategia a la hora de obtener elevados números de células NK (Sutlu et al., 2010).

Como perspectiva de futuro, se contempla la mejora del rendimiento de los procesos de producción ya existentes y un mayor desarrollo de técnicas como la obtención de células NK a partir de la reprogramación de células embrionarias o células madre pluripotentes inducidas junto con el cultivo con IL-21 (Knorr et al., 2013), todo ello enfocado a la obtención de terapias más específicas que tengan en cuenta la interacción receptor-ligando (Becker et al., 2016).

## **Las células NKAЕ muestran un fenotipo altamente citotóxico y median su actividad antimieloma a través de los receptores NKG2D y NKp30**

El estudio del perfil inmunofenotípico de las células NK en enfermedades malignas arroja gran información relativa al estado de activación del sistema inmune de los pacientes que presentan estas patologías. Los receptores de citotoxicidad, entre los que se encuentran NKG2D y los NCR, receptores de citotoxicidad natural, como NKp30, NKp44 y NK46 constituyen los principales mediadores de la respuesta inmune en NKs. Múltiples estudios han demostrado que la expresión de estos receptores suele encontrarse alterada en células NK en diversas patologías como el cáncer colorrectal (Rocca et al., 2013, Rocca et al., 2016), el cáncer de mama (Nieto-Velazquez et al., 2016), o la leucemia linfocítica crónica (Costello et al., 2012). Este hecho ha sido demostrado por otros grupos también en mieloma múltiple (von Lilienfeld-Toal et al., 2010, Eissens et al., 2012), inclusive en GMSI, estadio en el que se puede apreciar una desregulación únicamente en MO pudiendo constituir un mecanismo de inmunoescape inicial (Costello et al., 2013). Estos datos ponen de manifiesto la necesidad de actuar sobre estos receptores para poder otorgar el mayor potencial citotóxico a las células NK.

La expansión de células NK de pacientes de MM reveló que la expresión de los receptores de citotoxicidad aumentaba drásticamente (sobre todo la de NKG2D y NKp30, pero también la de NKp44 y NKp46) en las NKAЕ obtenidas lo que se correlacionaba con la elevada actividad citotóxica observada. Frente a una de las líneas celulares de MM utilizadas como diana se pudo apreciar que el bloqueo de los receptores NKG2D y NKp30 resultaba en una reducción del 26% de la citotoxicidad de las células NKAЕ. En este caso, estos dos receptores llegarían a ser responsables de la cuarta parte de la citotoxicidad total de las NKAЕs. Estos datos sustentan lo ya obtenido en líneas celulares de NK (Swift et al., 2012) y en células NKAЕ procedentes de donantes sanos (Garg et al., 2012). Si estos receptores tienen un papel tan importante en la eficacia de las células NK, los ligandos de éstos en células tumorales podrían constituir dianas terapéuticas potenciales en el tratamiento del MM (Lopez-Soto et al., 2015).

Nuestros datos también demuestran que los receptores NKG2D y NKp30 son claves para el correcto funcionamiento de las células NK frente a la célula tumoral clonogénica, ya que la citotoxicidad disminuyó de manera equivalente a la disminución observada frente a células tumorales totales, al bloquear estos receptores y observar el crecimiento de colonias en metilcelulosa. Existe una laguna en el estudio del papel de estos receptores en la destrucción de la célula tumoral clonogénica (o célula iniciadora de tumor), y más aún en células NK primarias de pacientes, por lo que los datos aquí presentados son pioneros en este ámbito.

Los hallazgos de microscopía no permiten evaluar directamente el papel de los dos receptores estudiados en la sinapsis inmunológica, pero la polarización observada mediante microscopía confocal, sumada a los hallazgos en los experimentos funcionales podrían indicar un papel relevante en el proceso de citotoxicidad. Para determinar si los receptores de citotoxicidad están implicados en la sinapsis inmunológica, dado que ya existen datos preliminares de su posible implicación en otras patologías hematológicas como la leucemia mieloide aguda (Khaznadar et al., 2014) sería necesario el estudio de las proteínas implicadas en la sinapsis. La integrina LFA-1 (cuyo reclutamiento a la membrana es necesario para desencadenar las señales que promueven la polarización de los gránulos líticos) o la actina, cuyo remodelado se produce durante la sinapsis (Brown et al., 2011) deberían mostrar una interacción o colocalización con los receptores de interés.

Otros receptores como DNAM-1 también se sobreexpresaban en células NKA.E. Estudios previos han demostrado que pacientes con MM activo mostraban menor expresión del receptor DNAM-1 en comparación con pacientes en remisión o donantes sanos. Actualmente los mecanismos a través de los cuales desencadena la destrucción de células tumorales no están completamente definidos (de Andrade et al., 2014), pero se sabe que está implicado en adhesión y en la citotoxicidad mediante control de la liberación de IFN- $\gamma$ . A su vez parece evidente que posee un papel en la actividad NK y que éste podría ser complementario al papel de NKG2D, ya que en estudios funcionales con células NK activadas con IL-2 se ha observado que la actividad citotóxica era mediada por DNAM-1 en aquellas líneas de MM en las que los ligandos de NKG2D mostraban una expresión prácticamente nula (El-Sherbiny et al., 2007). DNAM-1 podría

tener un papel más relevante, superior al de otros receptores, en aquellas patologías en las que se haya establecido la presencia de especies reactivas de oxígeno ya que se ha descrito que sus ligandos se sobreexpresan en condiciones de estrés oxidativo (Ardolino et al., 2011). Recientemente se ha descrito que en MM se producen especies reactivas de oxígeno (Kamihara et al., 2016, Riz et al., 2016) debido a la desregulación de ciertos genes como la ciclina D1 (Bustany et al., 2016) por lo que la acción de DNAM-1 se vería favorecida en el ambiente del MM.

Se observó sobreexpresión de SLAMF7 en células NKAЕ. Aunque su expresión se encuentra muy elevada en células de mieloma, y debido a ello existen terapias basadas en anticuerpos monoclonales frente a esta proteína (Einsele and Schreder, 2016), SLAMF7 también está presente en NKs. De hecho, parte de la actividad de estas nuevas terapias se basa en la inmunomodulación del sistema inmune a través de SLAMF7. Se ha descrito que las proteínas SLAM son ligandos de sí mismas, por lo que se podría pensar que un exceso de SLAMF7 en células NK favorecería una detección más eficaz de células de MM dada la elevada cantidad de SLAMF7 presente también en estas células (Dong et al., 2012). Por lo tanto, la sobreexpresión de SLAMF7 formaría parte del perfil de expresión altamente citotóxico que presentan las NKAЕ pudiendo ser utilizado como predictor del estado de activación de estas células.

Al igual que en otros estudios en los que se empleó este mismo método de expansión también se observó sobreexpresión de receptores implicados en activación temprana como CD69 y de ligandos de apoptosis como TRAIL (Szmania et al., 2015) . Es más, estos mismos estudios han demostrado que el bloqueo de CD69 supone una disminución de la citotoxicidad en células NK que, realizado conjuntamente al bloqueo de NKG2D, NCRs y DNAM-1 abole casi completamente la actividad de las NKAЕ otorgando a este receptor un papel relevante al nivel del resto de receptores activadores de citotoxicidad. En cambio, el bloqueo de los ligandos de apoptosis FasL y TRAIL no afectó la actividad citotóxica de las NKAЕ indicando que éstos últimos no serían los mediadores de la respuesta citotóxica más temprana en NKAЕs (Garg et al., 2012). La sobreexpresión de estas proteínas se encontraría relacionada en mayor medida con una respuesta citotóxica más lenta. En nuestro estudio sólo se observó una ligera sobreexpresión de TRAIL, la expresión de FasL no se modificó. Sería necesario estudiar



los mediadores implicados en las fases más tempranas del proceso de apoptosis en las células tumorales, como caspasa-8, 3 o 7 (Chavez-Galan et al., 2009, Glassner et al., 2012), para poder evaluar correctamente si la sobreexpresión de algunos de estos ligandos se correlaciona con una mayor citotoxicidad por esta vía.

El significado biológico de la disminución de la expresión de CD7 en células NK no está claro. CD7 se encuentra implicado en procesos de adhesión y en algunos casos se ha descrito que la pérdida total de la expresión de CD7 combinado con la presencia de anormalidades genéticas puede asociarse con un fenotipo maligno en patologías hematológicas como la leucemia aguda de células NK (Yoo et al., 2009). La disminución aquí observada fue muy leve (menor al 10%) y los niveles de expresión de CD7 continuaban siendo muy elevados en NKAEs. Las diferencias observadas podrían deberse a que la expresión de CD7 a lo largo de este estudio ha resultado ser muy estable en NKs por lo que pequeñas variaciones se traducirían en diferencias significativas.

## **Las células de la *side population* expresan ligandos de células NK y muestran características moleculares propias de célula madre tumoral**

Métodos muy variados se han empleado para la detección de células madre tumorales. De todos los métodos disponibles, la detección de la *side population* es de los más fiables ya que la detección no se basa en marcadores de membrana cuya expresión puede variar en multitud de circunstancias o en presencia de estímulos, si no que se encuentra directamente relacionado con la resistencia a fármacos, que es tanto una característica conservada de células madre como una causa directa de progresión de la enfermedad (Franqui-Machin et al., 2015). Estudios en otro tipo de neoplasias han demostrado que las células de la *side population* poseen mayor potencial replicativo y mayor capacidad de regenerar tejido que las células con alta expresión de ALDH (Gangavarapu et al., 2013). Adicionalmente, existen datos de que las células de la *side population* de MM muestran potencial clonogénico *in vitro* (Boesch et al., 2014, Yan et al., 2016) e incluso, *in vivo*, en modelos de ratón en los que la inyección subcutánea de un bajo número de células de la *side population* produjo tumor, mientras que no fue así en el caso de la inyección de células NSP (Jakubikova et al., 2011). Aún así sería necesario realizar un modelo de MM en ratón que realmente reproduzca la enfermedad en la que el grueso de la carga tumoral se encuentre localizado en MO.

En nuestras manos, la *side population* fue detectada tanto en líneas celulares de MM como en muestras de MO de pacientes con MM. Al igual que en los estudios del grupo del Dr. Mitsiades del Dana-Farber Cancer Institute, se detectó que su proporción era muy variable tanto en líneas celulares como en muestras de pacientes. En líneas celulares se observó también que, generalmente, la mayoría presentaban porcentajes muy bajos salvo RPMI-8226, que fue la única en mostrar un porcentaje superior a 2,2%. El hecho de que la muestra de LCP tuviese un porcentaje de células *side population* tan elevado podría ser un reflejo del estadio de la enfermedad, a mayor proporción de *side population*, mayor agresividad de la enfermedad dado el potencial clonogénico de estas células. En este sentido la presencia y abundancia de *side population* podría constituir un factor pronóstico de la evolución de la enfermedad.

En concordancia con estudios previos, el verapamilo y la fumitremorgina C resultaron ineficaces, por lo menos a concentración estándar, en la inhibición de las bombas de membranas encargadas de expulsar la sonda utilizada, mientras que la reserpina fue el único inhibidor capaz de eliminar, o al menos, disminuir, la presencia de *side population*. Esto haría pensar que el mecanismo predominante a través del cual las células madre de MM son resistentes a fármacos podría ser diferente al del resto de patologías cuya *side population* puede ser eliminada mediante verapamilo o fumitremorgina C. Los tres producen un bloqueo de los transportadores ABC de membrana, pero la fumitremorgina C bloquea selectivamente las bombas ABCG2 (Szolomajer-Csikos et al., 2013), cuyo papel se ha descrito inicialmente en cáncer de mama y, posteriormente, en células epiteliales como las del tracto digestivo y túbulo renal, lo que resulta de gran importancia en la resistencia a fármacos en estos tipos de cáncer (Horsey et al., 2016). Se ha encontrado elevada la expresión de ABCG2 en *side population* de diferentes tipos de células tumorales. En MM, se ha observado en varios estudios en el que el criterio de selección de células madre se realizó mediante selección de células CD138<sup>+</sup> únicamente en líneas celulares (Kolosenko et al., 2014, Yang et al., 2014, Yang et al., 2015) que, actualmente, no constituye un criterio consenso de selección de células madre. La expresión de diversos transportadores de membrana como ABCG2, ABCB1 (glicoproteína-P) y ABCC1 entre otros, también ha sido detectada por el grupo del Dr. Mitsiades en *side population* de líneas celulares de MM, pero los resultados obtenidos fueron muy variables en función de la línea utilizada.

En cambio, el verapamilo y la reserpina ejercen la mayor parte de su efecto sobre la glicoproteína-P (P-gp) cuya expresión en células de MM y su efecto sobre los distintos tratamientos utilizados en MM ha sido estudiada (Abraham et al., 2015). Aunque el verapamilo también ejerce parte de su efecto sobre las bombas ABCG2. De hecho, se ha demostrado que fármacos como el carfilzomib podrían aumentar la expresión de la P-gp afectando directamente y de manera negativa su propia absorción, otros como la lenalidomida son sustratos pero no regulan su expresión (Tong et al., 2014) y, otros como el bortezomib no se ven afectados y además inhiben parte de la actividad de la P-gp (O'Connor et al., 2013). Estos hallazgos no explican por qué el verapamilo no funciona en MM, pero es evidente que existe algún mecanismo subyacente a la acción principal

de estos inhibidores que favorece el efecto de la reserpina y que parecería indicar que implica directamente a la P-gp. La diferencia observada con la reserpina podría deberse a que el verapamilo actúa también sobre las bombas ABCG2 (Pena-Solorzano et al., 2016) no produciendo el 100% de su efecto sobre la P-gp. Esta vía de estudio podría esclarecer algunas de las lagunas existentes en el conocimiento de los mecanismos de resistencia a fármacos en MM.

Muchos estudios se han centrado en la caracterización fenotípica de la célula madre de MM. Varios coinciden en que la célula madre de MM, que posee potencial clonogénico *in vitro*, se caracteriza por carecer de expresión de CD138 o, al menos presentar una expresión relativamente baja (Matsui et al., 2008, Agarwal and Matsui, 2010). Otros grupos también han descrito la presencia de células CD138<sup>-</sup> en MM conjuntamente con la presencia de células *side population* en líneas celulares, pero pese a que las poblaciones llegan a solaparse, no lo hacen por completo (Jakubikova et al., 2011). Nuestros resultados no apoyan estos hallazgos. De hecho, mientras que en muestras de líneas celulares la expresión de CD138 se mantiene en *side population* respecto a las células NSP, en muestras de células primarias de MM la *side population* posee una expresión de CD138 mayor que la de las células NSP. Estos resultados fueron confirmados mediante secuenciación masiva de RNA. Esto concuerda con los hallazgos de Jacob H. Christensen con los que refutó la hipótesis de que las células madre de MM fueran CD138<sup>-</sup>. Encontró que esta población CD138<sup>-</sup> correspondía a una población apoptótica que siempre expresaba anexina-V y cuya morfología era propia de células que habían entrado en apoptosis tanto para líneas celulares como para muestras de pacientes. La aparición de esta población CD138<sup>-</sup>anexina-V<sup>+</sup> podría deberse al elevado tiempo de procesado de la muestra ya que las células de MM poseen una tasa de renovación de CD138 muy rápida y la pérdida de la expresión de CD138 podría producirse a las 3-4 horas de obtención de la muestra (Christensen et al., 2012). De existir esta población CD138<sup>-</sup>, se ha demostrado que no posee tumorigenicidad ni propiedades clonogénicas diferenciales respecto a la población CD138<sup>+</sup>, incluso *in vivo* (Paino et al., 2014).

Los datos obtenidos mediante NGS son preliminares dado el bajo número de muestras y los diferentes estadios que representan cada una de ellas. Resulta

complicado realizar comparaciones con otros estudios y encontrar coincidencias dado que en muchos casos pueden no utilizar los mismos algoritmos para el alineamiento. Existen estudios que han demostrado la sobreexpresión de oncogenes como SOX2, NANOG, OCT4, NOTCH y WNT en *side population* (Chen et al., 2007) y en células clonogénicas (Kim et al., 2015). Pese a ello, al igual que en otros estudios, el número de genes sobreexpresados implicados en el metabolismo de células madre representaba un porcentaje pequeño del total de genes sobreexpresados en *side population*, lo que no descarta que la *side population* sea la población de células madre tumorales (Kim et al., 2016). Dado que cada muestra primaria correspondía a un estadio de la enfermedad, se pudo apreciar que LCP presentaba mayor expresión de genes implicados en el metabolismo de células madre lo que podría estar relacionado con la mayor agresividad de la LCP respecto a MM. Existen pocos estudios que analicen el perfil de expresión de las células *side population* mediante NGS y menos aún en MM. Los resultados obtenidos en este estudio muestran datos preliminares que necesitan ser ampliados.

Los hallazgos encontrados por CMF y los hallazgos preliminares encontrados por NGS sumados a los datos ya existentes que confirman la resistencia a fármacos y el potencial clonogénico de la *side population* sientan las bases para afirmar que la *side population* podría constituir la población de células madre tumorales en mieloma múltiple. Por tanto, identificar potenciales dianas terapéuticas frente a esta población resulta esencial para que el tratamiento contra el MM se convierta en una cura, no sólo frenando la enfermedad si no atacándola desde la raíz.

La actividad de las células NK frente a MM ha sido ampliamente estudiada. No obstante, como ya se ha mencionado en varias ocasiones anteriormente, los estudios de actividad frente a la célula tumoral clonogénica son muy limitados y, en el caso del MM, los estudios frente a *side population* son prácticamente inexistentes. Existe alguna evidencia, detectada mediante microscopía *in vivo*, de que células del sistema inmune activadas por citoquinas son capaces de destruir la *side population* de células de melanoma (Wei et al., 2015), al igual que nuestros estudios (de CMF y NGS) lo demuestran en MM. Los ligandos de células NK se expresan por igual en *side population* que en células NSP (Luna et al., 2016, Yin et al., 2016) lo que sugiere que su sensibilidad a la acción citotóxica de las NKAEs no se encontraría disminuida pudiendo ser destruida,

en mayor medida, a través de los receptores anteriormente descritos NKG2D y NKp30, que ya mostraron ser esenciales para la actividad NK frente a células tumorales totales y cuyos ligandos, MICA, MICB y ULBPs se sobreexpresan en condiciones de estrés que se producen en cáncer (Huergo-Zapico et al., 2014, Acebes-Huerta et al., 2016) y en concreto en MM (Soriani et al., 2013). Esto confirmaría que los ligandos de NKG2D se encuentran implicados en la destrucción de las células de la *side population* (Wei et al., 2015).

Otros ligandos que mantienen su expresión en *side population* son los de DNAM-1 (CD112 y CD155). Pese a que en este estudio no se ha estudiado la implicación funcional de DNAM-1, se sabe que posee un papel importante en la destrucción de células tumorales después de los NCRs (Zhang et al., 2012). Estos datos definirían otra vía de destrucción de células *side population* a través de las NKAЕ, complementando la de los NCRs y sustentando la posibilidad de erradicar las células madre de MM mediante terapia celular con NKs.

Sin embargo, se deben tener en cuenta los mecanismos de inmunoescape que las células tumorales, sobre todo las células responsables de la resistencia a fármacos como la *side population*, puedan desarrollar para evadir la acción de las NKAЕ. Entre ellos, se podría pensar que la regulación de la expresión de receptores de apoptosis como TRAIL y FasL es uno de ellos, aunque como ya se ha visto, el mecanismo que desencadenan no parece ser la vía principal de citotoxicidad de las células NK a corto plazo (Garg et al., 2012). Sí que merecería especial desarrollo el estudio del papel de HLA-I (Gao et al., 2014, Cantoni et al., 2016) como mecanismo de inmunoescape. Se ha podido apreciar que HLA-I se encuentra sobreexpresado en la *side population* de las líneas celulares de MM y HLA-B en células primarias (en LCP). Además, la expresión de HLA-I se encuentra muy elevada en ambos tipos de muestras. Y, por otro lado, resultaría interesante evaluar la presencia de mecanismos de inmunoescape específicos para evitar la acción de NKG2D, NCRs y DNAM-1, como la secreción de factores solubles que producen la inhibición de estos receptores (Mamessier et al., 2011).

Estos hallazgos sentarían las bases para la terapia con CARs potenciando así la expresión de NKG2D en células NK y favoreciendo su actividad citotóxica.

## **La infusión de células NKAE autólogas no produce toxicidad y muestra eficacia en pacientes con MM refractario**

Actualmente, nuevos tratamientos frente a MM aparecen de forma habitual y cada vez más rápida. Nuevas terapias van abriéndose paso en un entorno en el que predomina el tratamiento quimioterapéutico. Dado que algunos de estos tratamientos, como los IMiDs cuya eficacia está comprobada, ejercen parte de su efecto estimulando el sistema inmune (Krieg and Ullrich, 2012), no es de extrañar que las terapias emergentes vayan por esta vía. La terapia biológica con anticuerpos monoclonales o la terapia con células T CAR son algunos de los ejemplos de estas nuevas terapias cuyo objetivo es potenciar el sistema inmune (Atanackovic et al., 2016, Garfall et al., 2016).

Uno de los primeros retos que se presentan a la hora de realizar una terapia celular autóloga es la obtención de la cantidad de células necesaria para poder producir la dosis de tratamiento. Nuestro estudio ha demostrado que la extracción repetida de SP en pacientes con MM es factible incluso en pacientes que reciben simultáneamente tratamiento antineoplásico. Adicionalmente, nuestro estudio evidencia que no es necesario realizar una aféresis para obtener un número inicial de células NK suficiente. Además, la realización de una aféresis es un proceso más costoso y complejo que una simple punción venosa, y, sobre todo, más invasivo y más arriesgado, ya que aumenta la probabilidad de sufrir infecciones (Valkovic et al., 2015, McAuliffe et al., 2016). Se ha demostrado también que se pueden realizar múltiples procesos repetidos de infusión en un breve espacio de tiempo. En otros tipos de terapia, como el uso de vacunas de fusión de células dendríticas y células de MM, el proceso de obtención es tedioso y excesivamente laborioso requiriendo aféresis y AMO de mucho volumen para la terapia, además de conllevar un proceso de cultivo igualmente largo y pasos repetidos de lavados, que sólo serían compensados con impacto clínico altamente relevante (Rosenblatt et al., 2011).

La expansión *ex vivo* de células NK procedentes de pacientes con MM también fue realizada sin problemas. Estudios realizados con muestras de donantes sanos muestran que la expansión de células NK procedentes de SP de donantes podría producir en

algunos casos un mayor número de células (Szmania et al., 2015). No obstante, con muestras de donantes siempre existirá el riesgo de producirse reacciones adversas o rechazo, ya sea debido a las propias NKs o a los linfocitos B o T acompañantes (Geller et al., 2011, Skeate et al., 2013).

En este estudio no se exploró la posibilidad de realizar expansiones de células NK criopreservadas. En la mayoría de tipos celulares la criopreservación y posterior descongelación supone la pérdida de un número elevado de células, lo que implicaría una extracción inicial de SP mucho mayor para poder anticiparse a este hecho, teniendo en cuenta que los pacientes ya se encuentran inmunodeprimidos. Los estudios de expansión *ex vivo* de células NKAЕ del grupo de la Universidad de Arkansas han mostrado también una pérdida de capacidad citotóxica en estas células tras criopreservación, inclusive frente a células K562, haciendo necesaria la reestimulación con IL-2 (Holubova et al., 2016). A pesar de ello, la recuperación de células tras reestimulación fue extremadamente baja (Szmania et al., 2015).

Los resultados obtenidos muestran que se puede realizar la expansión *ex vivo* de células NK a partir de SP de pacientes sin que el tratamiento antineoplásico de elección afecte al resultado final del proceso. La expansión se realizó por igual en los pacientes bajo tratamiento con LEN y en los pacientes con BOR+BEN, inclusive en las últimas fases de la enfermedad. Por tanto, pacientes que reciban tanto inmunomoduladores como inhibidores del proteasoma pueden ser elegibles para este tipo de terapia.

Este estudio es el primero en demostrar que la terapia con células NKAЕ puede combinarse con los fármacos antimieloma actuales en pacientes con MM refractario. El diseño del mismo ha permitido corroborar que la terapia con células NKAЕ autólogas posee un efecto clínico evidente en pacientes de mal pronóstico. Los sujetos participantes recibieron durante el ensayo clínico el mismo tratamiento antineoplásico que recibían previamente a su inclusión y del que, al menos, debían haber recibido un mínimo de 4 ciclos. Esto indica que cualquier efecto clínico observado se debería únicamente a la infusión de células NKAЕ. El primer paciente fue incluido en recaída tras 6 líneas de tratamiento. Al finalizar la terapia con NKAЕs presentó una respuesta parcial y la enfermedad se estabilizó durante más de un año. La segunda paciente, que también



se encontraba en recaída al iniciar la terapia experimental con NKAEs, también presentó respuesta parcial y estabilización de la enfermedad durante 9 meses. Esto representa que un 40% de los pacientes incluidos (50% de los pacientes que completaron el tratamiento) mostraron un beneficio clínico relevante y duradero. Además, el cuarto y quinto paciente presentaron estabilización de la enfermedad al finalizar el tratamiento, observándose un efecto directo de las NKAEs. Estos datos resultan alentadores en comparación con los de Szmania y sus colaboradores. En su ensayo clínico, utilizando como terapia NKAEs de donantes, sólo 1 paciente de 7 presentó una respuesta parcial mientras que en 5 no se frenó la progresión y en 1 sólo se frenó pocos meses (Szmania et al., 2015). En comparación con otros estudios descritos (Shi et al., 2008a, Klingemann et al., 2013), nuestro ensayo clínico es el único en demostrar que se pueden realizar infusiones repetidas de células NKAe en vez de una única infusión, este hecho podría constituir la base del efecto observado. En comparación con otras terapias celulares frente a MM, como las vacunas de células dendríticas, se ha apreciado mayor beneficio con la infusión de NKAEs. Nuestro ensayo ha permitido ver eficacia de las células NKAe en pacientes de mal pronóstico y en progresión. En cambio, los ensayos clínicos con vacunas de células dendríticas han mostrado como mucho cierta prolongación de la duración de la estabilización de la enfermedad en pacientes que ya presentaban enfermedad estable (Yi et al., 2010) o una mejora de la respuesta en combinación con TASPE en pacientes con enfermedad mínima residual (Rosenblatt et al., 2013).

Se pudo observar que la combinación de células NKAe con tratamiento antineoplásico basado en LEN mostraba mayor eficacia en pacientes que la basada en BOR, ya que dos pacientes tratados con LEN respondieron y mantuvieron la respuesta mientras que con BOR uno progresó y otro presentó una corta respuesta. Es sabido que tanto LEN (Gonzalez-Rodriguez et al., 2013, Acebes-Huerta et al., 2014) como BOR (Shi et al., 2008b, Niu et al., 2016) son capaces de favorecer la actividad NK o sensibilizar las células tumorales a la acción de las NKs. Además, las células NKAe fueron detectadas tras infusión en SP tal y como describió Szmania, pero en concordancia con otros estudios (Lundqvist et al., 2010, Lundqvist et al., 2011), se apreció que el incremento *in vivo* de células NKs tras infusión se produjo en mayor medida en los dos pacientes cuyo tratamiento antineoplásico se basaba en BOR.

La infusión de células NKAЕ no produjo ningún efecto adverso directamente relacionado con la terapia experimental. Únicamente los pacientes 1 y 2 presentaron neutropenia grado II y III una vez ya iniciado el tratamiento con células NKAЕ. En cambio, el resto de pacientes ya presentaba neutropenia antes de su inclusión en el ensayo debida al tratamiento antineoplásico recibido. Dado que durante el estudio todos los pacientes recibían el mismo tratamiento antineoplásico que recibían antes de su inclusión, el desarrollo de estas neutropenias podría relacionarse con el tratamiento farmacológico más que con la terapia con NKAЕs. Está descrito que tanto con LEN (Blumel and Broadway-Duren, 2014) como con BOR (Salvini et al., 2017) se suele producir toxicidad hematológica, y, dentro de ésta, la neutropenia es la más común.

Tampoco se observó ningún mecanismo de regulación negativa de la actividad de las células NKAЕ. Se estudió la presencia de células Treg dado que son responsables de la supresión de las células NK y T (Kerdiles et al., 2013, Gasteiger et al., 2015). En este sentido, la ausencia de administración de IL-2 podría favorecer la ausencia de estos mecanismos supresores ya que estudios previos han confirmado que la administración de IL-2 a pacientes oncológicos produce un aumento del número de linfocitos Treg supresores (Chinen et al., 2016). En los pacientes de nuestro ensayo el nivel de linfocitos Treg se mantuvo invariable. Únicamente, se debe destacar un aumento de los niveles de IL-10 al final del ciclo de tratamiento que se correspondió de manera inversa con la disminución de IFN- $\gamma$ . Se ha descrito que la IL-10 se encuentra asociada a mecanismos de regulación, pero su papel en la patogenia del MM sigue siendo una incógnita (Alexandrakis et al., 2015, Andre et al., 2015). Este aumento podría producirse para compensar el aumento de IFN- $\gamma$  debido a las NKAЕ infundidas circulantes. Aún así, ningún paciente presentó síntomas relacionados con el aumento de mecanismos de regulación negativa, y el incremento observado de IL-10 no tuvo ningún impacto directo en la prognosis de los pacientes.

Los resultados de este ensayo clínico demuestran que la activación de células NK utilizando la línea celular K562-mb15-41BBL es factible y permite la realización de múltiples infusiones de NKAЕs en pacientes con MM. Asimismo, el tratamiento de combinación basado en NKAЕs + LEN ha mostrado eficacia clínica. Estos hallazgos sumados a la ausencia de efectos adversos relacionados con la infusión de NKAЕs y la

seguridad de las células infundidas, hacen de esta nueva terapia de combinación de tratamiento antineoplásico y de infusión de dosis repetidas de NKAEs, un candidato perfecto para su desarrollo como futura línea de tratamiento para MM.

// Conclusiones



Las principales conclusiones extraídas a partir del presente trabajo son las siguientes:

1. Los pacientes con MM poseen una disfunción en sus células NK.
2. Las células NK procedentes de pacientes con MM pueden ser expandidas *ex vivo* mediante cocultivo con la línea k562-mb15-41BBL. Igualmente, es factible obtener grandes cantidades de células NKAЕ para su uso a escala clínica.
3. Estas células poseen una potente capacidad citotóxica frente a MM, muy superior a la de las células NK procedentes de pacientes con MM e incluso superior a la de células NK de donantes sanos.
4. Las células NKAЕ destruyen la célula tumoral clonogénica de MM.
5. La actividad citotóxica de las células NKAЕ se encuentra mediada, en parte, por los receptores de citotoxicidad NKG2D y NKp30. El correcto funcionamiento de éstos es esencial para que las células NKAЕ muestren una actividad citotóxica máxima frente a MM.
6. Las células NKAЕ destruyen la célula de la *side population* de MM. Asimismo, estas células muestran expresión de los ligandos para receptores activadores de células NKAЕ, como los de NKG2D y NKp30, pudiendo éstos constituir una potencial diana terapéutica en MM.
7. La realización de infusiones repetidas de células NKAЕ en pacientes con MM es totalmente segura y produce una reducción de la enfermedad, por lo que el tratamiento coadyuvante con células NKAЕ podría resultar una buena opción terapéutica en pacientes con MM refractario o en recaída. Asimismo, los datos obtenidos en este trabajo sientan las bases para el estudio de la infusión de células NKAЕ autólogas en estadios más precoces en combinación con fármacos antimieloma.



// Bibliografía





- ABRAHAM, J., SALAMA, N. N. & AZAB, A. K. 2015. The role of P-glycoprotein in drug resistance in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*, 56, 26-33.
- ABRUZZESE, M. P., BILOTTA, M. T., FIONDA, C., ZINGONI, A., SORIANI, A., VULPIS, E., BORRELLI, C., ZITTI, B., PETRUCCI, M. T., RICCIARDI, M. R., MOLFETTA, R., PAOLINI, R., SANTONI, A. & CIPPITELLI, M. 2016. Inhibition of bromodomain and extra-terminal (BET) proteins increases NKG2D ligand MICA expression and sensitivity to NK cell-mediated cytotoxicity in multiple myeloma cells: role of cMYC-IRF4-miR-125b interplay. *J Hematol Oncol*, 9, 134.
- ACEBES-HUERTA, A., HUERGO-ZAPICO, L., GONZALEZ-RODRIGUEZ, A. P., FERNANDEZ-GUIZAN, A., PAYER, A. R., LOPEZ-SOTO, A. & GONZALEZ, S. 2014. Lenalidomide induces immunomodulation in chronic lymphocytic leukemia and enhances antitumor immune responses mediated by NK and CD4 T cells. *Biomed Res Int*, 2014, 265840.
- ACEBES-HUERTA, A., LORENZO-HERRERO, S., FOLGUERAS, A. R., HUERGO-ZAPICO, L., LOPEZ-LARREA, C., LOPEZ-SOTO, A. & GONZALEZ, S. 2016. Drug-induced hyperploidy stimulates an antitumor NK cell response mediated by NKG2D and DNAM-1 receptors. *Oncoimmunology*, 5, e1074378.
- ADDLA, S. K., BROWN, M. D., HART, C. A., RAMANI, V. A. & CLARKE, N. W. 2008. Characterization of the Hoechst 33342 side population from normal and malignant human renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 295, F680-7.
- AGARWAL, J. R. & MATSUI, W. 2010. Multiple myeloma: a paradigm for translation of the cancer stem cell hypothesis. *Anticancer Agents Med Chem*, 10, 116-20.
- AHN, Y. O., KIM, S., KIM, T. M., SONG, E. Y., PARK, M. H. & HEO, D. S. 2013. Irradiated and activated autologous PBMCs induce expansion of highly cytotoxic human NK cells in vitro. *J Immunother*, 36, 373-81.
- AJANI, J. A., SONG, S., HOCHSTER, H. S. & STEINBERG, I. B. 2015. Cancer stem cells: the promise and the potential. *Semin Oncol*, 42 Suppl 1, S3-17.
- ALEXANDER, D. D., MINK, P. J., ADAMI, H. O., COLE, P., MANDEL, J. S., OKEN, M. M. & TRICHOPOULOS, D. 2007. Multiple myeloma: a review of the epidemiologic literature. *Int J Cancer*, 120 Suppl 12, 40-61.
- ALEXANDRAKIS, M. G., GOULIDAKI, N., PAPPA, C. A., BOULA, A., PSARAKIS, F., NEONAKIS, I. & TSIRAKIS, G. 2015. Interleukin-10 Induces Both Plasma Cell Proliferation and Angiogenesis in Multiple Myeloma. *Pathol Oncol Res*, 21, 929-34.
- ALMEIDA-OLIVEIRA, A., SMITH-CARVALHO, M., PORTO, L. C., CARDOSO-OLIVEIRA, J., RIBEIRO ADOS, S., FALCAO, R. R., ABDELHAY, E., BOUZAS, L. F., THULER, L. C., ORNELLAS, M. H. & DIAMOND, H. R. 2011. Age-related changes in natural killer cell receptors from childhood through old age. *Hum Immunol*, 72, 319-29.
- ANDRE, T., NAJAR, M., STAMATOPOULOS, B., PIETERS, K., PRADIER, O., BRON, D., MEULEMAN, N. & LAGNEAUX, L. 2015. Immune impairments in multiple myeloma bone marrow mesenchymal stromal cells. *Cancer Immunol Immunother*, 64, 213-24.
- ANTONIADOU, E. & DAVID, A. L. 2016. Placental stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 31, 13-29.
- ARDOLINO, M., ZINGONI, A., CERBONI, C., CECERE, F., SORIANI, A., IANNITTO, M. L. & SANTONI, A. 2011. DNAM-1 ligand expression on Ag-stimulated T lymphocytes is mediated by ROS-dependent activation of DNA-damage response: relevance for NK-T cell interaction. *Blood*, 117, 4778-86.
- ASHBURNER, M., BALL, C. A., BLAKE, J. A., BOTSTEIN, D., BUTLER, H., CHERRY, J. M., DAVIS, A. P., DOLINSKI, K., DWIGHT, S. S., EPPIG, J. T., HARRIS, M. A., HILL, D. P., ISSEL-TARVER, L., KASARSKIS, A., LEWIS, S., MATESE, J. C., RICHARDSON, J. E., RINGWALD, M., RUBIN, G. M. & SHERLOCK, G. 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet*, 25, 25-9.
- ATANACKOVIC, D., RADHAKRISHNAN, S. V., BHARDWAJ, N. & LUETKENS, T. 2016. Chimeric Antigen Receptor (CAR) therapy for multiple myeloma. *Br J Haematol*, 172, 685-98.

- AVERY, D. T., ELLYARD, J. I., MACKAY, F., CORCORAN, L. M., HODGKIN, P. D. & TANGYE, S. G. 2005. Increased expression of CD27 on activated human memory B cells correlates with their commitment to the plasma cell lineage. *J Immunol*, 174, 4034-42.
- AVIGAN, D., VASIR, B., GONG, J., BORGES, V., WU, Z., UHL, L., ATKINS, M., MIER, J., MCDERMOTT, D., SMITH, T., GIALLAMBARDO, N., STONE, C., SCHADT, K., DOLGOFF, J., TETREAULT, J. C., VILLARROEL, M. & KUFE, D. 2004. Fusion cell vaccination of patients with metastatic breast and renal cancer induces immunological and clinical responses. *Clin Cancer Res*, 10, 4699-708.
- BAE, J., MUNSHI, N. C. & ANDERSON, K. C. 2014. Immunotherapy strategies in multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am*, 28, 927-43.
- BARKHOLT, L., ALICI, E., CONRAD, R., SUTLU, T., GILLJAM, M., STELLAN, B., CHRISTENSSON, B., GUVEN, H., BJORKSTROM, N. K., SODERDAHL, G., CEDERLUND, K., KIMBY, E., ASCHAN, J., RINGDEN, O., LJUNGGREN, H. G. & DILBER, M. S. 2009. Safety analysis of ex vivo-expanded NK and NK-like T cells administered to cancer patients: a phase I clinical study. *Immunotherapy*, 1, 753-64.
- BARLOGIE, B., MITCHELL, A., VAN RHEE, F., EPSTEIN, J., MORGAN, G. J. & CROWLEY, J. 2014. Curing myeloma at last: defining criteria and providing the evidence. *Blood*, 124, 3043-51.
- BARLOGIE, B., SHAUGHNESSY, J., TRICOT, G., JACOBSON, J., ZANGARI, M., ANAISSIE, E., WALKER, R. & CROWLEY, J. 2004. Treatment of multiple myeloma. *Blood*, 103, 20-32.
- BAYCHELIER, F., SENNEPIN, A., ERMONVAL, M., DORGHAM, K., DEBRE, P. & VIEILLARD, V. 2013. Identification of a cellular ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. *Blood*, 122, 2935-42.
- BECKER, P. S., SUCK, G., NOWAKOWSKA, P., ULLRICH, E., SEIFRIED, E., BADER, P., TONN, T. & SEIDL, C. 2016. Selection and expansion of natural killer cells for NK cell-based immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*, 65, 477-84.
- BENSON, D. M., JR., BAKAN, C. E., MISHRA, A., HOFMEISTER, C. C., EFEBERA, Y., BECKNELL, B., BAIOCCHI, R. A., ZHANG, J., YU, J., SMITH, M. K., GREENFIELD, C. N., PORCU, P., DEVINE, S. M., ROTEM-YEHUDAR, R., LOZANSKI, G., BYRD, J. C. & CALIGIURI, M. A. 2010. The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody. *Blood*, 116, 2286-94.
- BERG, M., LUNDQVIST, A., MCCOY, P., JR., SAMSEL, L., FAN, Y., TAWAB, A. & CHILDS, R. 2009. Clinical-grade ex vivo-expanded human natural killer cells up-regulate activating receptors and death receptor ligands and have enhanced cytolytic activity against tumor cells. *Cytotherapy*, 11, 341-55.
- BIANCHI, G. & MUNSHI, N. C. 2015. Pathogenesis beyond the cancer clone(s) in multiple myeloma. *Blood*, 125, 3049-58.
- BJORKSTRAND, B., IACOBELLI, S., HEGENBART, U., GRUBER, A., GREINIX, H., VOLIN, L., NARNI, F., MUSTO, P., BEKSAC, M., BOSI, A., MILONE, G., CORRADINI, P., GOLDSCHMIDT, H., DE WITTE, T., MORRIS, C., NIEDERWIESER, D. & GAHRTON, G. 2011. Tandem autologous/reduced-intensity conditioning allogeneic stem-cell transplantation versus autologous transplantation in myeloma: long-term follow-up. *J Clin Oncol*, 29, 3016-22.
- BLADE, J. & KYLE, R. A. 1998. Multiple myeloma in young patients: clinical presentation and treatment approach. *Leuk Lymphoma*, 30, 493-501.
- BLADE, J., KYLE, R. A. & GREIPP, P. R. 1996a. Multiple myeloma in patients younger than 30 years. Report of 10 cases and review of the literature. *Arch Intern Med*, 156, 1463-8.
- BLADE, J., KYLE, R. A. & GREIPP, P. R. 1996b. Presenting features and prognosis in 72 patients with multiple myeloma who were younger than 40 years. *Br J Haematol*, 93, 345-51.
- BLAIR, A. & ZAHM, S. H. 1991. Cancer among farmers. *Occup Med*, 6, 335-54.
- BLUMEL, S. & BROADWAY-DUREN, J. 2014. Approaches to Managing Safety With Lenalidomide in Hematologic Malignancies. *J Adv Pract Oncol*, 5, 269-79.

- BOCK, A. M., KNORR, D. & KAUFMAN, D. S. 2013. Development, expansion, and in vivo monitoring of human NK cells from human embryonic stem cells (hESCs) and induced pluripotent stem cells (iPSCs). *J Vis Exp*, e50337.
- BOESCH, M., ZEIMET, A. G., REIMER, D., SCHMIDT, S., GASTL, G., PARSON, W., SPOECK, F., HATINA, J., WOLF, D. & SOPPER, S. 2014. The side population of ovarian cancer cells defines a heterogeneous compartment exhibiting stem cell characteristics. *Oncotarget*, 5, 7027-39.
- BOISSEL, L., BETANCUR-BOISSEL, M., LU, W., KRAUSE, D. S., VAN ETEN, R. A., WELS, W. S. & KLINGEMANN, H. 2013. Retargeting NK-92 cells by means of CD19- and CD20-specific chimeric antigen receptors compares favorably with antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Oncoimmunology*, 2, e26527.
- BOISSEL, L., BETANCUR, M., LU, W., WELS, W. S., MARINO, T., VAN ETEN, R. A. & KLINGEMANN, H. 2012. Comparison of mRNA and lentiviral based transfection of natural killer cells with chimeric antigen receptors recognizing lymphoid antigens. *Leuk Lymphoma*, 53, 958-65.
- BOISSEL, L., BETANCUR, M., WELS, W. S., TUNCER, H. & KLINGEMANN, H. 2009. Transfection with mRNA for CD19 specific chimeric antigen receptor restores NK cell mediated killing of CLL cells. *Leuk Res*, 33, 1255-9.
- BORRELLO, I. 2012. Can we change the disease biology of multiple myeloma? *Leuk Res*, 36 Suppl 1, S3-12.
- BOUCHER, K., PARQUET, N., WIDEN, R., SHAIN, K., BAZ, R., ALSINA, M., KOOMEN, J., ANASETTI, C., DALTON, W. & PEREZ, L. E. 2012. Stemness of B-cell progenitors in multiple myeloma bone marrow. *Clin Cancer Res*, 18, 6155-68.
- BRANDT, C. S., BARATIN, M., YI, E. C., KENNEDY, J., GAO, Z., FOX, B., HALDEMAN, B., OSTRANDER, C. D., KAIFU, T., CHABANNON, C., MORETTA, A., WEST, R., XU, W., VIVIER, E. & LEVIN, S. D. 2009. The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J Exp Med*, 206, 1495-503.
- BRAUD, V. M., ALLAN, D. S., O'CALLAGHAN, C. A., SODERSTROM, K., D'ANDREA, A., OGG, G. S., LAZETIC, S., YOUNG, N. T., BELL, J. I., PHILLIPS, J. H., LANIER, L. L. & MCMICHAEL, A. J. 1998. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature*, 391, 795-9.
- BRAUD, V. M. & MCMICHAEL, A. J. 1999. Regulation of NK cell functions through interaction of the CD94/NKG2 receptors with the nonclassical class I molecule HLA-E. *Curr Top Microbiol Immunol*, 244, 85-95.
- BROWN, A. C., ODDOS, S., DOBBIE, I. M., ALAKOSKELA, J. M., PARTON, R. M., EISSMANN, P., NEIL, M. A., DUNSBY, C., FRENCH, P. M., DAVIS, I. & DAVIS, D. M. 2011. Remodelling of cortical actin where lytic granules dock at natural killer cell immune synapses revealed by super-resolution microscopy. *PLoS Biol*, 9, e1001152.
- BUSTANY, S., BOURGEAIS, J., TCHAKARSKA, G., BODY, S., HERAULT, O., GOUILLEUX, F. & SOLA, B. 2016. Cyclin D1 unbalances the redox status controlling cell adhesion, migration, and drug resistance in myeloma cells. *Oncotarget*, 7, 45214-45224.
- CALAME, K. L. 2001. Plasma cells: finding new light at the end of B cell development. *Nat Immunol*, 2, 1103-8.
- CALAME, K. L., LIN, K. I. & TUNYAPLIN, C. 2003. Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells. *Annu Rev Immunol*, 21, 205-30.
- CALIGIURI, M. A. 2008. Human natural killer cells. *Blood*, 112, 461-9.
- CAMPBELL, A., BRIEVA, T., RAVIV, L., ROWLEY, J., NISS, K., BRANDWEIN, H., OH, S. & KARNIELI, O. 2015. Concise Review: Process Development Considerations for Cell Therapy. *Stem Cells Transl Med*, 4, 1155-63.
- CANTONI, C., HUERGO-ZAPICO, L., PARODI, M., PEDRAZZI, M., MINGARI, M. C., MORETTA, A., SPARATORE, B., GONZALEZ, S., OLIVE, D., BOTTINO, C., CASTRICONI, R. & VITALE, M.

2016. NK Cells, Tumor Cell Transition, and Tumor Progression in Solid Malignancies: New Hints for NK-Based Immunotherapy? *J Immunol Res*, 2016, 4684268.
- CARBONE, E., NERI, P., MESURACA, M., FULCINITI, M. T., OTSUKI, T., PENDE, D., GROH, V., SPIES, T., POLLIO, G., COSMAN, D., CATALANO, L., TASSONE, P., ROTOLI, B. & VENUTA, S. 2005. HLA class I, NKG2D, and natural cytotoxicity receptors regulate multiple myeloma cell recognition by natural killer cells. *Blood*, 105, 251-8.
- COOPER, M. A., FEHNIGER, T. A. & CALIGIURI, M. A. 2001. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*, 22, 633-40.
- COSTELLO, R. T., BOEHRER, A., SANCHEZ, C., MERCIER, D., BAIER, C., LE TREUT, T. & SEBAHOUN, G. 2013. Differential expression of natural killer cell activating receptors in blood versus bone marrow in patients with monoclonal gammopathy. *Immunology*, 139, 338-41.
- COSTELLO, R. T., KNOBLAUCH, B., SANCHEZ, C., MERCIER, D., LE TREUT, T. & SEBAHOUN, G. 2012. Expression of natural killer cell activating receptors in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology*, 135, 151-7.
- CRAIG, F. E. & FOON, K. A. 2008. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*, 111, 3941-67.
- CHABANNON, C., MFARREJ, B., GUIA, S., UGOLINI, S., DEVILLIER, R., BLAISE, D., VIVIER, E. & CALMELS, B. 2016. Manufacturing Natural Killer Cells as Medicinal Products. *Front Immunol*, 7, 504.
- CHAN, C. J., SMYTH, M. J. & MARTINET, L. 2014. Molecular mechanisms of natural killer cell activation in response to cellular stress. *Cell Death Differ*, 21, 5-14.
- CHANG, Y. H., CONNOLLY, J., SHIMASAKI, N., MIMURA, K., KONO, K. & CAMPANA, D. 2013. A chimeric receptor with NKG2D specificity enhances natural killer cell activation and killing of tumor cells. *Cancer Res*, 73, 1777-86.
- CHARAFE-JAUFFRET, E., GINESTIER, C., BERTUCCI, F., CABAUD, O., WICINSKI, J., FINETTI, P., JOSSELIN, E., ADELAIDE, J., NGUYEN, T. T., MONVILLE, F., JACQUEMIER, J., THOMASSIN-PIANA, J., PINNA, G., JALAGUIER, A., LAMBAUDIE, E., HOUVENAEGHEL, G., XERRI, L., HAREL-BELLAN, A., CHAFFANET, M., VIENS, P. & BIRNBAUM, D. 2013. ALDH1-positive cancer stem cells predict engraftment of primary breast tumors and are governed by a common stem cell program. *Cancer Res*, 73, 7290-300.
- CHAVEZ-GALAN, L., ARENAS-DEL ANGEL, M. C., ZENTENO, E., CHAVEZ, R. & LASCURAIN, R. 2009. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol*, 6, 15-25.
- CHEENT, K. & KHAKOO, S. I. 2009. Natural killer cells: integrating diversity with function. *Immunology*, 126, 449-57.
- CHEN, J. H., CHUNG, C. H., WANG, Y. C., HSU, S. N., HUANG, W. Y. & CHIEN, W. C. 2016. Prevalence and Mortality-Related Factors of Multiple Myeloma in Taiwan. *PLoS One*, 11, e0167227.
- CHEN, S., CHOO, A. B., NAI-DY, W., HENG-PHON, T. & OH, S. K. 2007. Knockdown of Oct-4 or Sox-2 attenuates neurogenesis of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*, 16, 413-20.
- CHENG, M., CHEN, Y., XIAO, W., SUN, R. & TIAN, Z. 2013. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cell Mol Immunol*, 10, 230-52.
- CHILDS, R. W. & BERG, M. 2013. Bringing natural killer cells to the clinic: ex vivo manipulation. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2013, 234-46.
- CHINEN, T., KANNAN, A. K., LEVINE, A. G., FAN, X., KLEIN, U., ZHENG, Y., GASTEIGER, G., FENG, Y., FONTENOT, J. D. & RUDENSKY, A. Y. 2016. An essential role for the IL-2 receptor in Treg cell function. *Nat Immunol*, 17, 1322-1333.
- CHNG, W. J., SANTANA-DAVILA, R., VAN WIER, S. A., AHMANN, G. J., JALAL, S. M., BERGSAGEL, P. L., CHESI, M., TRENDLE, M. C., JACOBUS, S., BLOOD, E., OKEN, M. M., HENDERSON, K., KYLE, R. A., GERTZ, M. A., LACY, M. Q., DISPENZIERI, A., GREIPP, P. R. & FONSECA, R. 2006. Prognostic factors for hyperdiploid-myeloma: effects of chromosome 13 deletions and IgH translocations. *Leukemia*, 20, 807-13.

- CHO, D. & CAMPANA, D. 2009. Expansion and activation of natural killer cells for cancer immunotherapy. *Korean J Lab Med*, 29, 89-96.
- CHO, F. N., CHANG, T. H., SHU, C. W., KO, M. C., LIAO, S. K., WU, K. H., YU, M. S., LIN, S. J., HONG, Y. C., CHEN, C. H., HUNG, C. H. & CHANG, Y. H. 2014. Enhanced cytotoxicity of natural killer cells following the acquisition of chimeric antigen receptors through trogocytosis. *PLoS One*, 9, e109352.
- CHRETIEN, M. L., HEBRAUD, B., CANCES-LAUWERS, V., HULIN, C., MARIT, G., LELEU, X., KARLIN, L., ROUSSEL, M., STOPPA, A. M., GUILHOT, F., LAMY, T., GARDERET, L., PEGOURIE, B., DIB, M., SEBBAN, C., LENAIN, P., BRECHIGNAC, S., ROYER, B., WETTERWALD, M., LEGROS, L., ORSINI-PIOCELLE, F., VOILLAT, L., DELBREL, X., CAILLOT, D., MACRO, M., FACON, T., ATTAL, M., MOREAU, P., AVET-LOISEAU, H. & CORRE, J. 2014. Age is a prognostic factor even among patients with multiple myeloma younger than 66 years treated with high-dose melphalan: the IFM experience on 2316 patients. *Haematologica*, 99, 1236-8.
- CHRISTENSEN, J. H., JENSEN, P. V., KRISTENSEN, I. B., ABILDGAARD, N., LODAHL, M. & RASMUSSEN, T. 2012. Characterization of potential CD138 negative myeloma "stem cells". *Haematologica*, 97, e18-20.
- CHU, J., DENG, Y., BENSON, D. M., HE, S., HUGHES, T., ZHANG, J., PENG, Y., MAO, H., YI, L., GHOSH, K., HE, X., DEVINE, S. M., ZHANG, X., CALIGIURI, M. A., HOFMEISTER, C. C. & YU, J. 2014. CS1-specific chimeric antigen receptor (CAR)-engineered natural killer cells enhance in vitro and in vivo antitumor activity against human multiple myeloma. *Leukemia*, 28, 917-27.
- CHUBB, D., WEINHOLD, N., BRODERICK, P., CHEN, B., JOHNSON, D. C., FORSTI, A., VIJAYAKRISHNAN, J., MIGLIORINI, G., DOBBINS, S. E., HOLROYD, A., HOSE, D., WALKER, B. A., DAVIES, F. E., GREGORY, W. A., JACKSON, G. H., IRVING, J. A., PRATT, G., FEGAN, C., FENTON, J. A., NEBEN, K., HOFFMANN, P., NOTHEN, M. M., MUHLEISEN, T. W., EISELE, L., ROSS, F. M., STRAKA, C., EINSELE, H., LANGER, C., DORNER, E., ALLAN, J. M., JAUCH, A., MORGAN, G. J., HEMMINKI, K., HOULSTON, R. S. & GOLDSCHMIDT, H. 2013. Common variation at 3q26.2, 6p21.33, 17p11.2 and 22q13.1 influences multiple myeloma risk. *Nat Genet*, 45, 1221-5.
- DAMDIMOPOULOU, P., RODIN, S., STENFELT, S., ANTONSSON, L., TRYGGVASON, K. & HOVATTA, O. 2016. Human embryonic stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 31, 2-12.
- DANKBAR, B., PADRO, T., LEO, R., FELDMANN, B., KROPFF, M., MESTERS, R. M., SERVE, H., BERDEL, W. E. & KIENAST, J. 2000. Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma. *Blood*, 95, 2630-6.
- DAVIES, F. E., RAJE, N., HIDESHIMA, T., LENTZSCH, S., YOUNG, G., TAI, Y. T., LIN, B., PODAR, K., GUPTA, D., CHAUHAN, D., TREON, S. P., RICHARDSON, P. G., SCHLOSSMAN, R. L., MORGAN, G. J., MULLER, G. W., STIRLING, D. I. & ANDERSON, K. C. 2001. Thalidomide and immunomodulatory derivatives augment natural killer cell cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood*, 98, 210-6.
- DAVIS, M. R., ZHU, Z., HANSEN, D. M., BAI, Q. & FANG, Y. 2015. The role of IL-21 in immunity and cancer. *Cancer Lett*, 358, 107-14.
- DE ANDRADE, L. F., SMYTH, M. J. & MARTINET, L. 2014. DNAM-1 control of natural killer cells functions through nectin and nectin-like proteins. *Immunol Cell Biol*, 92, 237-44.
- DEMBIC, Z., SCHENCK, K. & BOGEN, B. 2000. Dendritic cells purified from myeloma are primed with tumor-specific antigen (idiotype) and activate CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 2697-702.
- DENMAN, C. J., SENYUKOV, V. V., SOMANCHI, S. S., PHATARPEKAR, P. V., KOPP, L. M., JOHNSON, J. L., SINGH, H., HURTON, L., MAITI, S. N., HULS, M. H., CHAMPLIN, R. E., COOPER, L. J. & LEE, D. A. 2012. Membrane-bound IL-21 promotes sustained ex vivo proliferation of human natural killer cells. *PLoS One*, 7, e30264.

- DHAKAL, B., GIRNIUS, S. & HARI, P. 2016. Recent advances in understanding multiple myeloma. *F1000Res*, 5.
- DHODAPKAR, M. V., GELLER, M. D., CHANG, D. H., SHIMIZU, K., FUJII, S., DHODAPKAR, K. M. & KRASOVSKY, J. 2003. A reversible defect in natural killer T cell function characterizes the progression of premalignant to malignant multiple myeloma. *J Exp Med*, 197, 1667-76.
- DI SANTO, J. P. 2006. Natural killer cell developmental pathways: a question of balance. *Annu Rev Immunol*, 24, 257-86.
- DI STASI, A., TEY, S. K., DOTTI, G., FUJITA, Y., KENNEDY-NASSER, A., MARTINEZ, C., STRAATHOF, K., LIU, E., DURETT, A. G., GRILLEY, B., LIU, H., CRUZ, C. R., SAVOLDO, B., GEE, A. P., SCHINDLER, J., KRANCE, R. A., HESLOP, H. E., SPENCER, D. M., ROONEY, C. M. & BRENNER, M. K. 2011. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N Engl J Med*, 365, 1673-83.
- DIMOPOULOS, M. A. & KASTRITIS, E. 2008. Thalidomide plus dexamethasone as primary therapy for newly diagnosed patients with multiple myeloma. *Nat Clin Pract Oncol*, 5, 690-1.
- DONG, Z., DAVIDSON, D., PEREZ-QUINTERO, L. A., KUROSAKI, T., SWAT, W. & VEILLETTE, A. 2012. The adaptor SAP controls NK cell activation by regulating the enzymes Vav-1 and SHIP-1 and by enhancing conjugates with target cells. *Immunity*, 36, 974-85.
- DONNELLY, J. P., BLIJLEVEN, N. M. & VAN DER VELDEN, W. J. 2014. Host impairments in patients with neoplastic diseases. *Cancer Treat Res*, 161, 1-41.
- EGAN, J. B., SHI, C. X., TEMBE, W., CHRISTOFORIDES, A., KURDOGLU, A., SINARI, S., MIDDHA, S., ASMANN, Y., SCHMIDT, J., BRAGGIO, E., KEATS, J. J., FONSECA, R., BERGSAGEL, P. L., CRAIG, D. W., CARPTEN, J. D. & STEWART, A. K. 2012. Whole-genome sequencing of multiple myeloma from diagnosis to plasma cell leukemia reveals genomic initiating events, evolution, and clonal tides. *Blood*, 120, 1060-6.
- EGUIZABAL, C., ZENARRUZABEITIA, O., MONGE, J., SANTOS, S., VESGA, M. A., MARURI, N., ARRIETA, A., RINON, M., TAMAYO-ORBEGOZO, E., AMO, L., LARRUCEA, S. & BORREGO, F. 2014. Natural killer cells for cancer immunotherapy: pluripotent stem cells-derived NK cells as an immunotherapeutic perspective. *Front Immunol*, 5, 439.
- EINSELE, H. & SCHREDER, M. 2016. Treatment of multiple myeloma with the immunostimulatory SLAMF7 antibody elotuzumab. *Ther Adv Hematol*, 7, 288-301.
- EISSENS, D. N., SPANHOLTZ, J., VAN DER MEER, A., VAN CRANENBROEK, B., DOLSTRA, H., KWEKKEBOOM, J., PREIJERS, F. W. & JOOSTEN, I. 2012. Defining early human NK cell developmental stages in primary and secondary lymphoid tissues. *PLoS One*, 7, e30930.
- EL-SHERBINY, Y. M., MEADE, J. L., HOLMES, T. D., MCGONAGLE, D., MACKIE, S. L., MORGAN, A. W., COOK, G., FEYLER, S., RICHARDS, S. J., DAVIES, F. E., MORGAN, G. J. & COOK, G. P. 2007. The requirement for DNAM-1, NKG2D, and NKp46 in the natural killer cell-mediated killing of myeloma cells. *Cancer Res*, 67, 8444-9.
- ERIKSSON, M. 1993. Rheumatoid arthritis as a risk factor for multiple myeloma: a case-control study. *Eur J Cancer*, 29A, 259-63.
- ESHAR, Z., WAKS, T., GROSS, G. & SCHINDLER, D. G. 1993. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 720-4.
- FAIRFIELD, H., FALANK, C., AVERY, L. & REAGAN, M. R. 2016. Multiple myeloma in the marrow: pathogenesis and treatments. *Ann N Y Acad Sci*, 1364, 32-51.
- FAUSSNER, F. & DEMPKE, W. C. 2012. Multiple myeloma: myeloablative therapy with autologous stem cell support versus chemotherapy: a meta-analysis. *Anticancer Res*, 32, 2103-9.
- FENG, X., YAN, J., WANG, Y., ZIERATH, J. R., NORDENSKJOLD, M., HENTER, J. I., FADEEL, B. & ZHENG, C. 2010. The proteasome inhibitor bortezomib disrupts tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression and natural killer (NK) cell killing of TRAIL receptor-positive multiple myeloma cells. *Mol Immunol*, 47, 2388-96.

- FIONDA, C., ABRUZZESE, M. P., ZINGONI, A., SORIANI, A., RICCI, B., MOLFETTA, R., PAOLINI, R., SANTONI, A. & CIPPITELLI, M. 2015a. Nitric oxide donors increase PVR/CD155 DNAM-1 ligand expression in multiple myeloma cells: role of DNA damage response activation. *BMC Cancer*, 15, 17.
- FIONDA, C., SORIANI, A., ZINGONI, A., SANTONI, A. & CIPPITELLI, M. 2015b. NKG2D and DNAM-1 Ligands: Molecular Targets for NK Cell-Mediated Immunotherapeutic Intervention in Multiple Myeloma. *Biomed Res Int*, 2015, 178698.
- FIORETTI, D., IURESCIA, S., FAZIO, V. M. & RINALDI, M. 2010. DNA vaccines: developing new strategies against cancer. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 174378.
- FLORES-MONTERO, J., DE TUTE, R., PAIVA, B., PEREZ, J. J., BOTTCHER, S., WIND, H., SANOJA, L., PUIG, N., LECREVISSE, Q., VIDRIALES, M. B., VAN DONGEN, J. J. & ORFAO, A. 2016. Immunophenotype of normal vs. myeloma plasma cells: Toward antibody panel specifications for MRD detection in multiple myeloma. *Cytometry B Clin Cytom*, 90, 61-72.
- FOWLER, J. A., EDWARDS, C. M. & CROUCHER, P. I. 2011. Tumor-host cell interactions in the bone disease of myeloma. *Bone*, 48, 121-8.
- FRANQUI-MACHIN, R., WENDLANDT, E. B., JANZ, S., ZHAN, F. & TRICOT, G. 2015. Cancer stem cells are the cause of drug resistance in multiple myeloma: fact or fiction? *Oncotarget*, 6, 40496-506.
- FRIEDMANN-MORVINSKI, D., BENDAVID, A., WAKS, T., SCHINDLER, D. & ESHHAR, Z. 2005. Redirected primary T cells harboring a chimeric receptor require costimulation for their antigen-specific activation. *Blood*, 105, 3087-93.
- FUJISAKI, H., KAKUDA, H., SHIMASAKI, N., IMAI, C., MA, J., LOCKEY, T., ELDRIDGE, P., LEUNG, W. H. & CAMPANA, D. 2009. Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy. *Cancer Res*, 69, 4010-7.
- FURUKAWA, Y. & KIKUCHI, J. 2015. Molecular pathogenesis of multiple myeloma. *Int J Clin Oncol*, 20, 413-22.
- GABERT, J., BEILLARD, E., VAN DER VELDEN, V. H., BI, W., GRIMWADE, D., PALLISGAARD, N., BARBANY, G., CAZZANIGA, G., CAYUELA, J. M., CAVE, H., PANE, F., AERTS, J. L., DE MICHELI, D., THIRION, X., PRADEL, V., GONZALEZ, M., VIEHMANN, S., MALEC, M., SAGLIO, G. & VAN DONGEN, J. J. 2003. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia*, 17, 2318-57.
- GALLAGHER, R. P., SPINELLI, J. J., ELWOOD, J. M. & SKIPPEN, D. H. 1983. Allergies and agricultural exposure as risk factors for multiple myeloma. *Br J Cancer*, 48, 853-7.
- GANGAVARAPU, K. J., AZABDAFTARI, G., MORRISON, C. D., MILLER, A., FOSTER, B. A. & HUSS, W. J. 2013. Aldehyde dehydrogenase and ATP binding cassette transporter G2 (ABCG2) functional assays isolate different populations of prostate stem cells where ABCG2 function selects for cells with increased stem cell activity. *Stem Cell Res Ther*, 4, 132.
- GAO, M., GAO, L., YANG, G., TAO, Y., HOU, J., XU, H., HU, X., HAN, Y., ZHANG, Q., ZHAN, F., WU, X. & SHI, J. 2014. Myeloma cells resistance to NK cell lysis mainly involves an HLA class I-dependent mechanism. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 46, 597-604.
- GARCIA-MUNOZ, R., LOPEZ-DIAZ-DE-CERIO, A., FELIU, J., PANIZO, A., GIRALDO, P., RODRIGUEZ-CALVILLO, M., GRANDE, C., PENA, E., OLAVE, M., PANIZO, C. & INOGES, S. 2016. Follicular lymphoma: in vitro effects of combining lymphokine-activated killer (LAK) cell-induced cytotoxicity and rituximab- and obinutuzumab-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) activity. *Immunol Res*, 64, 548-57.
- GARCIA-SANZ, R., GONZALEZ, M., ORFAO, A., MORO, M. J., HERNANDEZ, J. M., BORREGO, D., CARNERO, M., CASANOVA, F., BAREZ, A., JIMENEZ, R., PORTERO, J. A. & SAN MIGUEL, J. F. 1996. Analysis of natural killer-associated antigens in peripheral blood and bone



- marrow of multiple myeloma patients and prognostic implications. *Br J Haematol*, 93, 81-8.
- GARCIA-SANZ, R., ORFAO, A., GONZALEZ, M., TABERNERO, M. D., BLADE, J., MORO, M. J., FERNANDEZ-CALVO, J., SANZ, M. A., PEREZ-SIMON, J. A., RASILLO, A. & MIGUEL, J. F. 1999. Primary plasma cell leukemia: clinical, immunophenotypic, DNA ploidy, and cytogenetic characteristics. *Blood*, 93, 1032-7.
- GARFALL, A. L., STADTMAUER, E. A. & JUNE, C. H. 2016. Chimeric Antigen Receptor T Cells in Myeloma. *N Engl J Med*, 374, 194.
- GARG, T. K., SZMANIA, S. M., KHAN, J. A., HOERING, A., MALBROUGH, P. A., MORENO-BOST, A., GREENWAY, A. D., LINGO, J. D., LI, X., YACCOBY, S., SUVA, L. J., STORRIE, B., TRICOT, G., CAMPANA, D., SHAUGHNESSY, J. D., JR., NAIR, B. P., BELLAMY, W. T., EPSTEIN, J., BARLOGIE, B. & VAN RHEE, F. 2012. Highly activated and expanded natural killer cells for multiple myeloma immunotherapy. *Haematologica*, 97, 1348-56.
- GASSER, S. & RAULET, D. 2006. The DNA damage response, immunity and cancer. *Semin Cancer Biol*, 16, 344-7.
- GASTEIGER, G., FAN, X., DIKIY, S., LEE, S. Y. & RUDENSKY, A. Y. 2015. Tissue residency of innate lymphoid cells in lymphoid and nonlymphoid organs. *Science*, 350, 981-5.
- GELLER, M. A., COOLEY, S., JUDSON, P. L., GHEBRE, R., CARSON, L. F., ARGENTA, P. A., JONSON, A. L., PANOSKALTSIS-MORTARI, A., CURTSINGER, J., MCKENNA, D., DUSENBERY, K., BLISS, R., DOWNS, L. S. & MILLER, J. S. 2011. A phase II study of allogeneic natural killer cell therapy to treat patients with recurrent ovarian and breast cancer. *Cytotherapy*, 13, 98-107.
- GENE ONTOLOGY, C. 2015. Gene Ontology Consortium: going forward. *Nucleic Acids Res*, 43, D1049-56.
- GINESTIER, C., HUR, M. H., CHARAFE-JAUFFRET, E., MONVILLE, F., DUTCHER, J., BROWN, M., JACQUEMIER, J., VIENS, P., KLEER, C. G., LIU, S., SCHOTT, A., HAYES, D., BIRNBAUM, D., WICHA, M. S. & DONTU, G. 2007. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*, 1, 555-67.
- GLASSNER, A., EISENHARDT, M., KRAMER, B., KORNER, C., COENEN, M., SAUERBRUCH, T., SPENGLER, U. & NATTERMANN, J. 2012. NK cells from HCV-infected patients effectively induce apoptosis of activated primary human hepatic stellate cells in a TRAIL-, FasL- and NKG2D-dependent manner. *Lab Invest*, 92, 967-77.
- GODFREY, J. & BENSON, D. M., JR. 2012. The role of natural killer cells in immunity against multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*, 53, 1666-76.
- GONG, J. H., MAKI, G. & KLINGEMANN, H. G. 1994. Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia*, 8, 652-8.
- GONZALEZ-RODRIGUEZ, A. P., PAYER, A. R., ACEBES-HUERTA, A., HUERGO-ZAPICO, L., VILLA-ALVAREZ, M., GONZALEZ-GARCIA, E. & GONZALEZ, S. 2013. Lenalidomide and chronic lymphocytic leukemia. *Biomed Res Int*, 2013, 932010.
- GONZALEZ, D., VAN DER BURG, M., GARCIA-SANZ, R., FENTON, J. A., LANGERAK, A. W., GONZALEZ, M., VAN DONGEN, J. J., SAN MIGUEL, J. F. & MORGAN, G. J. 2007. Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood*, 110, 3112-21.
- GRANZIN, M., SOLTENBORN, S., MULLER, S., KOLLET, J., BERG, M., CERWENKA, A., CHILDS, R. W. & HUPPERT, V. 2015. Fully automated expansion and activation of clinical-grade natural killer cells for adoptive immunotherapy. *Cytotherapy*, 17, 621-32.
- GRANZIN, M., STOJANOVIC, A., MILLER, M., CHILDS, R., HUPPERT, V. & CERWENKA, A. 2016. Highly efficient IL-21 and feeder cell-driven ex vivo expansion of human NK cells with therapeutic activity in a xenograft mouse model of melanoma. *Oncoimmunology*, 5, e1219007.

- GREENFIELD, E. A., NGUYEN, K. A. & KUCHROO, V. K. 1998. CD28/B7 costimulation: a review. *Crit Rev Immunol*, 18, 389-418.
- GREGOIRE, C., CHASSON, L., LUCI, C., TOMASELLO, E., GEISSMANN, F., VIVIER, E. & WALZER, T. 2007. The trafficking of natural killer cells. *Immunol Rev*, 220, 169-82.
- GREIPP, P. R., SAN MIGUEL, J., DURIE, B. G., CROWLEY, J. J., BARLOGIE, B., BLADE, J., BOCCADORO, M., CHILD, J. A., AVET-LOISEAU, H., KYLE, R. A., LAHUERTA, J. J., LUDWIG, H., MORGAN, G., POWLES, R., SHIMIZU, K., SHUSTIK, C., SONNEVELD, P., TOSI, P., TURESSON, I. & WESTIN, J. 2005. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol*, 23, 3412-20.
- GRIVENNIKOV, S. I., GRETEN, F. R. & KARIN, M. 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140, 883-99.
- GRUPP, S. A., KALOS, M., BARRETT, D., APLENC, R., PORTER, D. L., RHEINGOLD, S. R., TEACHEY, D. T., CHEW, A., HAUCK, B., WRIGHT, J. F., MILONE, M. C., LEVINE, B. L. & JUNE, C. H. 2013. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med*, 368, 1509-18.
- HAAS, H., ANDERS, S., BORNKAMM, G. W., MANNWEILER, E., SCHMITZ, H., RADL, J. & SCHLAAK, M. 1990. Do infections induce monoclonal immunoglobulin components? *Clin Exp Immunol*, 81, 435-40.
- HAMBURGER, A. & SALMON, S. E. 1977a. Primary bioassay of human myeloma stem cells. *J Clin Invest*, 60, 846-54.
- HAMBURGER, A. W. & SALMON, S. E. 1977b. Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science*, 197, 461-3.
- HANSSON, L., RABBANI, H., FAGERBERG, J., OSTERBORG, A. & MELLSTEDT, H. 2003. T-cell epitopes within the complementarity-determining and framework regions of the tumor-derived immunoglobulin heavy chain in multiple myeloma. *Blood*, 101, 4930-6.
- HAYASHI, T., HIDESHIMA, T., AKIYAMA, M., RAJE, N., RICHARDSON, P., CHAUHAN, D. & ANDERSON, K. C. 2003. Ex vivo induction of multiple myeloma-specific cytotoxic T lymphocytes. *Blood*, 102, 1435-42.
- HAYHOE, R. P., HENSON, S. M., AKBAR, A. N. & PALMER, D. B. 2010. Variation of human natural killer cell phenotypes with age: identification of a unique KLRG1-negative subset. *Hum Immunol*, 71, 676-81.
- HEIDENREICH, S., ZU EULENBURG, C., HILDEBRANDT, Y., STUBIG, T., SIERICH, H., BADBARAN, A., EIERMANN, T. H., BINDER, T. M. & KROGER, N. 2012. Impact of the NK cell receptor LIR-1 (ILT-2/CD85j/LILRB1) on cytotoxicity against multiple myeloma. *Clin Dev Immunol*, 2012, 652130.
- HENGVELD, P. J. & KERSTEN, M. J. 2015. B-cell activating factor in the pathophysiology of multiple myeloma: a target for therapy? *Blood Cancer J*, 5, e282.
- HERBERMAN, R. B., NUNN, M. E. & LAVRIN, D. H. 1975. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int J Cancer*, 16, 216-29.
- HERMANSON, D. L., BENDZICK, L., PRIBYL, L., MCCULLAR, V., VOGEL, R. I., MILLER, J. S., GELLER, M. A. & KAUFMAN, D. S. 2016. Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Natural Killer Cells for Treatment of Ovarian Cancer. *Stem Cells*, 34, 93-101.
- HINRICHS, C. S. & ROSENBERG, S. A. 2014. Exploiting the curative potential of adoptive T-cell therapy for cancer. *Immunol Rev*, 257, 56-71.
- HOLUBOVA, M., MIKLIKOVA, M., LEBA, M., GEORGIEV, D., JINDRA, P., CAPRND, M., CICCOCIOPPO, R., KRZULIAK, P. & LYSAK, D. 2016. Cryopreserved NK cells in the treatment of haematological malignancies: preclinical study. *J Cancer Res Clin Oncol*, 142, 2561-2567.
- HONG, S., LI, H., QIAN, J., YANG, J., LU, Y. & YI, Q. 2012. Optimizing dendritic cell vaccine for immunotherapy in multiple myeloma: tumour lysates are more potent tumour antigens

- than idiotype protein to promote anti-tumour immunity. *Clin Exp Immunol*, 170, 167-77.
- HORSEY, A. J., COX, M. H., SARWAT, S. & KERR, I. D. 2016. The multidrug transporter ABCG2: still more questions than answers. *Biochem Soc Trans*, 44, 824-30.
- HUERGO-ZAPICO, L., ACEBES-HUERTA, A., LOPEZ-SOTO, A., VILLA-ALVAREZ, M., GONZALEZ-RODRIGUEZ, A. P. & GONZALEZ, S. 2014. Molecular Bases for the Regulation of NKG2D Ligands in Cancer. *Front Immunol*, 5, 106.
- HUGHES, T., DEININGER, M., HOCHHAUS, A., BRANFORD, S., RADICH, J., KAEDA, J., BACCARANI, M., CORTES, J., CROSS, N. C., DRUKER, B. J., GABERT, J., GRIMWADE, D., HEHLMANN, R., KAMEL-REID, S., LIPTON, J. H., LONGTINE, J., MARTINELLI, G., SAGLIO, G., SOVERINI, S., STOCK, W. & GOLDMAN, J. M. 2006. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood*, 108, 28-37.
- IMAI, C., IWAMOTO, S. & CAMPANA, D. 2005. Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells. *Blood*, 106, 376-83.
- INTERNATIONAL MYELOMA FOUNDATION 2016. Concise Review of the Disease and Treatment Options.
- ISHIGAMI, S., NATSUGOE, S., TOKUDA, K., NAKAJO, A., XIANGMING, C., IWASHIGE, H., ARIDOME, K., HOKITA, S. & AIKOU, T. 2000. Clinical impact of intratumoral natural killer cell and dendritic cell infiltration in gastric cancer. *Cancer Lett*, 159, 103-8.
- ISOMAKI, H. A., HAKULINEN, T. & JOUTSENLAHTI, U. 1978. Excess risk of lymphomas, leukemia and myeloma in patients with rheumatoid arthritis. *J Chronic Dis*, 31, 691-6.
- JAKUBIKOVA, J., ADAMIA, S., KOST-ALIMOVA, M., KLIPPEL, S., CERVI, D., DALEY, J. F., CHOLUJOVA, D., KONG, S. Y., LEIBA, M., BLOTTA, S., OOI, M., DELMORE, J., LAUBACH, J., RICHARDSON, P. G., SEDLAK, J., ANDERSON, K. C. & MITSIADES, C. S. 2011. Lenalidomide targets clonogenic side population in multiple myeloma: pathophysiologic and clinical implications. *Blood*, 117, 4409-19.
- JIANG, H., ZHANG, W., SHANG, P., ZHANG, H., FU, W., YE, F., ZENG, T., HUANG, H., ZHANG, X., SUN, W., MAN-YUEN SZE, D., YI, Q. & HOU, J. 2014. Transfection of chimeric anti-CD138 gene enhances natural killer cell activation and killing of multiple myeloma cells. *Mol Oncol*, 8, 297-310.
- JONES, R. J., ZUEHLSDORF, M., ROWLEY, S. D., HILTON, J., SANTOS, G. W., SENSENBRENNER, L. L. & COLVIN, O. M. 1987. Variability in 4-hydroperoxycyclophosphamide activity during clinical purging for autologous bone marrow transplantation. *Blood*, 70, 1490-4.
- KAIFU, T., ESCALIERE, B., GASTINEL, L. N., VIVIER, E. & BARATIN, M. 2011. B7-H6/NKp30 interaction: a mechanism of alerting NK cells against tumors. *Cell Mol Life Sci*, 68, 3531-9.
- KAMIHARA, Y., TAKADA, K., SATO, T., KAWANO, Y., MURASE, K., ARIHARA, Y., KIKUCHI, S., HAYASAKA, N., USAMI, M., IYAMA, S., MIYANISHI, K., SATO, Y., KOBUNE, M. & KATO, J. 2016. The iron chelator deferasirox induces apoptosis by targeting oncogenic Pyk2/beta-catenin signaling in human multiple myeloma. *Oncotarget*, 7, 64330-64341.
- KANNAN, G. S., AQUINO-LOPEZ, A. & LEE, D. A. 2016. Natural killer cells in malignant hematology: A primer for the non-immunologist. *Blood Rev*.
- KASTRITIS, E., PALUMBO, A. & DIMOPOULOS, M. A. 2009. Treatment of relapsed/refractory multiple myeloma. *Semin Hematol*, 46, 143-57.
- KATODRITOU, E., TERPOS, E., NORTH, J., KOTTARIDIS, P., VERROU, E., GASTARI, V., CHADJIAGGELIDOU, C., SIVAKUMARAN, S., JIDE-BANWO, S., TSIROGIANNI, M., KAPETANOS, D., ZERVAS, K. & LOWDELL, M. W. 2011. Tumor-primed natural killer cells from patients with multiple myeloma lyse autologous, NK-resistant, bone marrow-derived malignant plasma cells. *Am J Hematol*, 86, 967-73.

- KAZANDJIAN, D. 2016. Multiple myeloma epidemiology and survival: A unique malignancy. *Semin Oncol*, 43, 676-681.
- KERDILES, Y., UGOLINI, S. & VIVIER, E. 2013. T cell regulation of natural killer cells. *J Exp Med*, 210, 1065-8.
- KHAZNADAR, Z., HENRY, G., SETTERBLAD, N., AGAUGUE, S., RAFFOUX, E., BOISSEL, N., DOMBRET, H., TOUBERT, A. & DULPHY, N. 2014. Acute myeloid leukemia impairs natural killer cells through the formation of a deficient cytotoxic immunological synapse. *Eur J Immunol*, 44, 3068-80.
- KIESSLING, R., KLEIN, E., PROSS, H. & WIGZELL, H. 1975. "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol*, 5, 117-21.
- KIM, D., PARK, C. Y., MEDEIROS, B. C. & WEISSMAN, I. L. 2012. CD19-CD45 low/- CD38 high/CD138+ plasma cells enrich for human tumorigenic myeloma cells. *Leukemia*, 26, 2530-7.
- KIM, G. R., HA, G. H., BAE, J. H., OH, S. O., KIM, S. H. & KANG, C. D. 2015. Metastatic colon cancer cell populations contain more cancer stem-like cells with a higher susceptibility to natural killer cell-mediated lysis compared with primary colon cancer cells. *Oncol Lett*, 9, 1641-1646.
- KIM, M. C., KIM, N. Y., SEO, Y. R. & KIM, Y. 2016. An Integrated Analysis of the Genome-Wide Profiles of DNA Methylation and mRNA Expression Defining the Side Population of a Human Malignant Mesothelioma Cell Line. *J Cancer*, 7, 1668-1679.
- KLINGEMANN, H. 2014. Are natural killer cells superior CAR drivers? *Oncoimmunology*, 3, e28147.
- KLINGEMANN, H. 2015. Challenges of cancer therapy with natural killer cells. *Cytotherapy*, 17, 245-9.
- KLINGEMANN, H., BOISSEL, L. & TONEGUZZO, F. 2016. Natural Killer Cells for Immunotherapy - Advantages of the NK-92 Cell Line over Blood NK Cells. *Front Immunol*, 7, 91.
- KLINGEMANN, H., GRODMAN, C., CUTLER, E., DUQUE, M., KADIDLO, D., KLEIN, A. K., SPRAGUE, K. A., MILLER, K. B., COMENZO, R. L., KEWALRAMANI, T., YU, N., VAN ETEN, R. A. & MCKENNA, D. H. 2013. Autologous stem cell transplant recipients tolerate haploidentical related-donor natural killer cell-enriched infusions. *Transfusion*, 53, 412-8; quiz 411.
- KLINGEMANN, H. G. 2013. Cellular therapy of cancer with natural killer cells-where do we stand? *Cytotherapy*, 15, 1185-94.
- KNORR, D. A., NI, Z., HERMANSON, D., HEXUM, M. K., BENDZICK, L., COOPER, L. J., LEE, D. A. & KAUFMAN, D. S. 2013. Clinical-scale derivation of natural killer cells from human pluripotent stem cells for cancer therapy. *Stem Cells Transl Med*, 2, 274-83.
- KOCHENDERFER, J. N., DUDLEY, M. E., CARPENTER, R. O., KASSIM, S. H., ROSE, J. J., TELFORD, W. G., HAKIM, F. T., HALVERSON, D. C., FOWLER, D. H., HARDY, N. M., MATO, A. R., HICKSTEIN, D. D., GEA-BANACLOCHE, J. C., PAVLETIC, S. Z., SPORTES, C., MARIC, I., FELDMAN, S. A., HANSEN, B. G., WILDER, J. S., BLACKLOCK-SCHUVER, B., JENA, B., BISHOP, M. R., GRESS, R. E. & ROSENBERG, S. A. 2013. Donor-derived CD19-targeted T cells cause regression of malignancy persisting after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 122, 4129-39.
- KOEPSSELL, S. A., MILLER, J. S. & MCKENNA, D. H., JR. 2013. Natural killer cells: a review of manufacturing and clinical utility. *Transfusion*, 53, 404-10.
- KOLOSENKO, I., GRANDER, D. & TAMM, K. P. 2014. IL-6 activated JAK/STAT3 pathway and sensitivity to Hsp90 inhibitors in multiple myeloma. *Curr Med Chem*, 21, 3042-7.
- KORETH, J., KIM, H. T., JONES, K. T., LANGE, P. B., REYNOLDS, C. G., CHAMMAS, M. J., DUSENBURY, K., WHANGBO, J., NIKIFOROW, S., ALYEA, E. P., 3RD, ARMAND, P., CUTLER, C. S., HO, V. T., CHEN, Y. B., AVIGAN, D., BLAZAR, B. R., ANTIN, J. H., RITZ, J. & SOIFFER,

- R. J. 2016. Efficacy, durability, and response predictors of low-dose interleukin-2 therapy for chronic graft-versus-host disease. *Blood*, 128, 130-7.
- KORETH, J., MATSUOKA, K., KIM, H. T., MCDONOUGH, S. M., BINDRA, B., ALYEA, E. P., 3RD, ARMAND, P., CUTLER, C., HO, V. T., TREISTER, N. S., BIENFANG, D. C., PRASAD, S., TZACHANIS, D., JOYCE, R. M., AVIGAN, D. E., ANTIN, J. H., RITZ, J. & SOIFFER, R. J. 2011. Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. *N Engl J Med*, 365, 2055-66.
- KRAJ, M., POGLOD, R., KOPEC-SZLEZAK, J., SOKOLOWSKA, U., WOZNIAK, J. & KRUK, B. 2004. C-kit receptor (CD117) expression on plasma cells in monoclonal gammopathies. *Leuk Lymphoma*, 45, 2281-9.
- KRIEG, S. & ULLRICH, E. 2012. Novel immune modulators used in hematology: impact on NK cells. *Front Immunol*, 3, 388.
- KUMAR, S. K., LEE, J. H., LAHUERTA, J. J., MORGAN, G., RICHARDSON, P. G., CROWLEY, J., HAESSLER, J., FEATHER, J., HOERING, A., MOREAU, P., LELEU, X., HULIN, C., KLEIN, S. K., SONNEVELD, P., SIEGEL, D., BLADE, J., GOLDSCHMIDT, H., JAGANNATH, S., MIGUEL, J. S., ORLOWSKI, R., PALUMBO, A., SEZER, O., RAJKUMAR, S. V., DURIE, B. G. & INTERNATIONAL MYELOMA WORKING, G. 2012. Risk of progression and survival in multiple myeloma relapsing after therapy with IMiDs and bortezomib: a multicenter international myeloma working group study. *Leukemia*, 26, 149-57.
- KUMAR, S. K., RAJKUMAR, S. V., DISPENZIERI, A., LACY, M. Q., HAYMAN, S. R., BUADI, F. K., ZELDENRUST, S. R., DINGLI, D., RUSSELL, S. J., LUST, J. A., GREIPP, P. R., KYLE, R. A. & GERTZ, M. A. 2008. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood*, 111, 2516-20.
- KYLE, R. A. 1990. Multiple myeloma. An update on diagnosis and management. *Acta Oncol*, 29, 1-8.
- KYLE, R. A., GERTZ, M. A., WITZIG, T. E., LUST, J. A., LACY, M. Q., DISPENZIERI, A., FONSECA, R., RAJKUMAR, S. V., OFFORD, J. R., LARSON, D. R., PLEVAK, M. E., THERNEAU, T. M. & GREIPP, P. R. 2003. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc*, 78, 21-33.
- KYLE, R. A. & RAJKUMAR, S. V. 2008. Multiple myeloma. *Blood*, 111, 2962-72.
- KYLE, R. A., REMSTEIN, E. D., THERNEAU, T. M., DISPENZIERI, A., KURTIN, P. J., HODNEFIELD, J. M., LARSON, D. R., PLEVAK, M. F., JELINEK, D. F., FONSECA, R., MELTON, L. J., 3RD & RAJKUMAR, S. V. 2007. Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *N Engl J Med*, 356, 2582-90.
- KYLE, R. A., THERNEAU, T. M., RAJKUMAR, S. V., LARSON, D. R., PLEVAK, M. F., OFFORD, J. R., DISPENZIERI, A., KATZMANN, J. A. & MELTON, L. J., 3RD 2006. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med*, 354, 1362-9.
- LANDGREN, O., LINET, M. S., MCMASTER, M. L., GRIDLEY, G., HEMMINKI, K. & GOLDIN, L. R. 2006. Familial characteristics of autoimmune and hematologic disorders in 8,406 multiple myeloma patients: a population-based case-control study. *Int J Cancer*, 118, 3095-8.
- LANDGREN, O., RAJKUMAR, S. V., PFEIFFER, R. M., KYLE, R. A., KATZMANN, J. A., DISPENZIERI, A., CAI, Q., GOLDIN, L. R., CAPORASO, N. E., FRAUMENI, J. F., BLOT, W. J. & SIGNORELLO, L. B. 2010. Obesity is associated with an increased risk of monoclonal gammopathy of undetermined significance among black and white women. *Blood*, 116, 1056-9.
- LANIER, L. L. 2005. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol*, 23, 225-74.
- LAPTEVA, N., DURETT, A. G., SUN, J., ROLLINS, L. A., HUYE, L. L., FANG, J., DANDEKAR, V., MEI, Z., JACKSON, K., VERA, J., ANDO, J., NGO, M. C., COUSTAN-SMITH, E., CAMPANA, D., SZMANIA, S., GARG, T., MORENO-BOST, A., VANRHEE, F., GEE, A. P. & ROONEY, C. M. 2012. Large-scale ex vivo expansion and characterization of natural killer cells for clinical applications. *Cytotherapy*, 14, 1131-43.
- LAPTEVA, N., SZMANIA, S. M., VAN RHEE, F. & ROONEY, C. M. 2014. Clinical grade purification and expansion of natural killer cells. *Crit Rev Oncog*, 19, 121-32.

- LAWASUT, P., GROEN, R. W., DHIMOLEA, E., RICHARDSON, P. G., ANDERSON, K. C. & MITSIADES, C. S. 2013. Decoding the pathophysiology and the genetics of multiple myeloma to identify new therapeutic targets. *Semin Oncol*, 40, 537-48.
- LEE, D. A. 2016. Regulatory Considerations for NK Cells Used in Human Immunotherapy Applications. *Methods Mol Biol*, 1441, 347-61.
- LEE, D. W., KOCHENDERFER, J. N., STETLER-STEVENSON, M., CUI, Y. K., DELBROOK, C., FELDMAN, S. A., FRY, T. J., ORENTAS, R., SABATINO, M., SHAH, N. N., STEINBERG, S. M., STRONCEK, D., TSCHERNIA, N., YUAN, C., ZHANG, H., ZHANG, L., ROSENBERG, S. A., WAYNE, A. S. & MACKALL, C. L. 2015. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*, 385, 517-28.
- LEE, J. J., CHOI, B. H., KANG, H. K., PARK, M. S., PARK, J. S., KIM, S. K., PHAM, T. N., CHO, D., NAM, J. H., KIM, Y. J., RHEE, J. H., YANG, D. H., KIM, Y. K., KIM, H. J. & CHUNG, I. J. 2007. Induction of multiple myeloma-specific cytotoxic T lymphocyte stimulation by dendritic cell pulsing with purified and optimized myeloma cell lysates. *Leuk Lymphoma*, 48, 2022-31.
- LEUNG, W., IYENGAR, R., LEIMIG, T., HOLLADAY, M. S., HOUSTON, J. & HANDGRETINGER, R. 2005. Phenotype and function of human natural killer cells purified by using a clinical-scale immunomagnetic method. *Cancer Immunol Immunother*, 54, 389-94.
- LI, L., LIU, L. N., FELLER, S., ALLEN, C., SHIVAKUMAR, R., FRATANTONI, J., WOLFRAIM, L. A., FUJISAKI, H., CAMPANA, D., CHOPAS, N., DZEKUNOV, S. & PESHWA, M. 2010. Expression of chimeric antigen receptors in natural killer cells with a regulatory-compliant non-viral method. *Cancer Gene Ther*, 17, 147-54.
- LJUNGGREN, H. G. & KARRE, K. 1990. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*, 11, 237-44.
- LOHR, J. G., STOJANOV, P., CARTER, S. L., CRUZ-GORDILLO, P., LAWRENCE, M. S., AUCLAIR, D., SOUGNEZ, C., KNOEHEL, B., GOULD, J., SAKSENA, G., CIBULSKIS, K., MCKENNA, A., CHAPMAN, M. A., STRAUSSMAN, R., LEVY, J., PERKINS, L. M., KEATS, J. J., SCHUMACHER, S. E., ROSENBERG, M., MULTIPLE MYELOMA RESEARCH, C., GETZ, G. & GOLUB, T. R. 2014. Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy. *Cancer Cell*, 25, 91-101.
- LONG, E. O., KIM, H. S., LIU, D., PETERSON, M. E. & RAJAGOPALAN, S. 2013. Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annu Rev Immunol*, 31, 227-58.
- LOPEZ-SOTO, A., HUERGO-ZAPICO, L., ACEBES-HUERTA, A., VILLA-ALVAREZ, M. & GONZALEZ, S. 2015. NKG2D signaling in cancer immunosurveillance. *Int J Cancer*, 136, 1741-50.
- LOTH, T. S., PERROTTA, A. L., LIMA, J., WHITEAKER, R. S. & ROBINSON, A. 1991. Genetic aspects of familial multiple myeloma. *Mil Med*, 156, 430-3.
- LOZANO, R., NAGHAVI, M., FOREMAN, K., LIM, S., SHIBUYA, K., ABOYANS, V., ABRAHAM, J., ADAIR, T., AGGARWAL, R., AHN, S. Y., ALVARADO, M., ANDERSON, H. R., ANDERSON, L. M., ANDREWS, K. G., ATKINSON, C., BADDOUR, L. M., BARKER-COLLO, S., BARTELS, D. H., BELL, M. L., BENJAMIN, E. J., BENNETT, D., BHALLA, K., BIKBOV, B., BIN ABDULHAK, A., BIRBECK, G., BLYTH, F., BOLLIGER, I., BOUFIOUS, S., BUCELLO, C., BURCH, M., BURNEY, P., CARAPETIS, J., CHEN, H., CHOU, D., CHUGH, S. S., COFFENG, L. E., COLAN, S. D., COLQUHOUN, S., COLSON, K. E., CONDON, J., CONNOR, M. D., COOPER, L. T., CORRIERE, M., CORTINOVIS, M., DE VACCARO, K. C., COUSER, W., COWIE, B. C., CRIQUI, M. H., CROSS, M., DABHADKAR, K. C., DAHODWALA, N., DE LEO, D., DEGENHARDT, L., DELOSSANTOS, A., DENENBERG, J., DES JARLAIS, D. C., DHARMARATNE, S. D., DORSEY, E. R., DRISCOLL, T., DUBER, H., EBEL, B., ERWIN, P. J., ESPINDOLA, P., EZZATI, M., FEIGIN, V., FLAXMAN, A. D., FOROUZANFAR, M. H., FOWKES, F. G., FRANKLIN, R., FRANSEN, M., FREEMAN, M. K., GABRIEL, S. E., GAKIDOU, E., GASPARI, F., GILLUM, R. F., GONZALEZ-MEDINA, D., HALASA, Y. A., HARING, D., HARRISON, J. E., HAVMOELLER, R., HAY, R. J.,

- HOEN, B., HOTEZ, P. J., HOY, D., JACOBSEN, K. H., JAMES, S. L., JASRASARIA, R., JAYARAMAN, S., JOHNS, N., KARTHIKEYAN, G., KASSEBAUM, N., KEREN, A., KHOO, J. P., KNOWLTON, L. M., KOBUSINGYE, O., KORANTENG, A., KRISHNAMURTHI, R., LIPNICK, M., LIPSHULTZ, S. E., OHNO, S. L., et al. 2012. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 380, 2095-128.
- LUEVANO, M., DOMOGALA, A., BLUNDELL, M., JACKSON, N., PEDROZA-PACHECO, I., DERNIAME, S., ESCOBEDO-COUSIN, M., QUEROL, S., THRASHER, A., MADRIGAL, A. & SAUDEMONT, A. 2014. Frozen cord blood hematopoietic stem cells differentiate into higher numbers of functional natural killer cells in vitro than mobilized hematopoietic stem cells or freshly isolated cord blood hematopoietic stem cells. *PLoS One*, 9, e87086.
- LUM, L. G., THAKUR, A., KONDADASULA, S. V., AL-KADHIMI, Z., DEOL, A., TOMASZEWSKI, E. N., YANO, H., SCHALK, D. L., AYASH, L., ZONDER, J. A., UBERTI, J. P., ABIDI, M. H. & RATANATHARATHORN, V. 2016. Targeting CD138-/CD20+ Clonogenic Myeloma Precursor Cells Decreases These Cells and Induces Transferable Antimyeloma Immunity. *Biol Blood Marrow Transplant*, 22, 869-78.
- LUNA, J. I., GROSSENBACHER, S. K., MURPHY, W. J. & CANTER, R. J. 2016. Targeting Cancer Stem Cells with Natural Killer Cell Immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther*, 1-12.
- LUNDQVIST, A., ABRAMS, S. I., SCHRUMP, D. S., ALVAREZ, G., SUFFREDINI, D., BERG, M. & CHILDS, R. 2006. Bortezomib and depsipeptide sensitize tumors to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand: a novel method to potentiate natural killer cell tumor cytotoxicity. *Cancer Res*, 66, 7317-25.
- LUNDQVIST, A., BERG, M., SMITH, A. & CHILDS, R. W. 2011. Bortezomib Treatment to Potentiate the Anti-tumor Immunity of Ex-vivo Expanded Adoptively Infused Autologous Natural Killer Cells. *J Cancer*, 2, 383-5.
- LUNDQVIST, A., SU, S., RAO, S. & CHILDS, R. 2010. Cutting edge: bortezomib-treated tumors sensitized to NK cell apoptosis paradoxically acquire resistance to antigen-specific T cells. *J Immunol*, 184, 1139-42.
- MAHER, J., BRENTJENS, R. J., GUNSET, G., RIVIERE, I. & SADELAIN, M. 2002. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor. *Nat Biotechnol*, 20, 70-5.
- MAMESSIER, E., SYLVAIN, A., BERTUCCI, F., CASTELLANO, R., FINETTI, P., HOUVENAEGHEL, G., CHARAFFE-JAUFRET, E., BIRNBAUM, D., MORETTA, A. & OLIVE, D. 2011. Human breast tumor cells induce self-tolerance mechanisms to avoid NKG2D-mediated and DNAM-mediated NK cell recognition. *Cancer Res*, 71, 6621-32.
- MASUYAMA, J., MURAKAMI, T., IWAMOTO, S. & FUJITA, S. 2016. Ex vivo expansion of natural killer cells from human peripheral blood mononuclear cells co-stimulated with anti-CD3 and anti-CD52 monoclonal antibodies. *Cytotherapy*, 18, 80-90.
- MATSUI, W., HUFF, C. A., WANG, Q., MALEHORN, M. T., BARBER, J., TANHEHCO, Y., SMITH, B. D., CIVIN, C. I. & JONES, R. J. 2004. Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood*, 103, 2332-6.
- MATSUI, W., WANG, Q., BARBER, J. P., BRENNAN, S., SMITH, B. D., BORRELLO, I., MCNIECE, I., LIN, L., AMBINDER, R. F., PEACOCK, C., WATKINS, D. N., HUFF, C. A. & JONES, R. J. 2008. Clonogenic multiple myeloma progenitors, stem cell properties, and drug resistance. *Cancer Res*, 68, 190-7.
- MATSUOKA, K., KORETH, J., KIM, H. T., BASCUG, G., MCDONOUGH, S., KAWANO, Y., MURASE, K., CUTLER, C., HO, V. T., ALYEA, E. P., ARMAND, P., BLAZAR, B. R., ANTIN, J. H., SOIFFER, R. J. & RITZ, J. 2013. Low-dose interleukin-2 therapy restores regulatory T cell homeostasis in patients with chronic graft-versus-host disease. *Sci Transl Med*, 5, 179ra43.

- MCAULIFFE, E., O'SHEA, S. & KHAN, M. I. 2016. PO-02 - Retrospective audit of the Peripherally Inserted Central Catheter (PICC) associated thrombosis in patients with haematological malignancies at Cork University Hospital. *Thromb Res*, 140 Suppl 1, S176.
- MILAZZO, C., REICHARDT, V. L., MULLER, M. R., GRUNEBACH, F. & BROSSART, P. 2003. Induction of myeloma-specific cytotoxic T cells using dendritic cells transfected with tumor-derived RNA. *Blood*, 101, 977-82.
- MILLER, J. S., OELKERS, S., VERFAILLIE, C. & MCGLAVE, P. 1992. Role of monocytes in the expansion of human activated natural killer cells. *Blood*, 80, 2221-9.
- MIRANDA-LORENZO, I., DORADO, J., LONARDO, E., ALCALA, S., SERRANO, A. G., CLAUSELL-TORMOS, J., CIOFFI, M., MEGIAS, D., ZAGORAC, S., BALIC, A., HIDALGO, M., ERKAN, M., KLEEFF, J., SCARPA, A., SAINZ, B., JR. & HEESCHEN, C. 2014. Intracellular autofluorescence: a biomarker for epithelial cancer stem cells. *Nat Methods*, 11, 1161-9.
- MITSIADES, C. S., MITSIADES, N. S., MUNSHI, N. C., RICHARDSON, P. G. & ANDERSON, K. C. 2006. The role of the bone microenvironment in the pathophysiology and therapeutic management of multiple myeloma: interplay of growth factors, their receptors and stromal interactions. *Eur J Cancer*, 42, 1564-73.
- MITSIADES, N., MITSIADES, C. S., POULAKI, V., CHAUHAN, D., RICHARDSON, P. G., HIDESHIMA, T., MUNSHI, N., TREON, S. P. & ANDERSON, K. C. 2002. Biologic sequelae of nuclear factor-kappaB blockade in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood*, 99, 4079-86.
- MOREAU, P., SAN MIGUEL, J., LUDWIG, H., SCHOUTEN, H., MOHTY, M., DIMOPOULOS, M., DREYLING, M. & GROUP, E. G. W. 2013. Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 24 Suppl 6, vi133-7.
- MORGAN, G. J., WALKER, B. A. & DAVIES, F. E. 2012. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer*, 12, 335-48.
- MORGAN, R. A., YANG, J. C., KITANO, M., DUDLEY, M. E., LAURENCOT, C. M. & ROSENBERG, S. A. 2010. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther*, 18, 843-51.
- MORRISON, V. A. 2014. Infections in patients with leukemia and lymphoma. *Cancer Treat Res*, 161, 319-49.
- MOSHAVER, B., VAN RHENEN, A., KELDER, A., VAN DER POL, M., TERWIJN, M., BACHAS, C., WESTRA, A. H., OSSENKOPPELE, G. J., ZWEEGMAN, S. & SCHUURHUIS, G. J. 2008. Identification of a small subpopulation of candidate leukemia-initiating cells in the side population of patients with acute myeloid leukemia. *Stem Cells*, 26, 3059-67.
- MOZAFFARI, F., HANSSON, L., KIAII, S., JU, X., ROSSMANN, E. D., RABBANI, H., MELLSTEDT, H. & OSTERBORG, A. 2004. Signalling molecules and cytokine production in T cells of multiple myeloma-increased abnormalities with advancing stage. *Br J Haematol*, 124, 315-24.
- MUCCIO, V. E., SARACI, E., GILESTRO, M., GATTEI, V., ZUCCHETTO, A., ASTOLFI, M., RUGGERI, M., MARZANATI, E., PASSERA, R., PALUMBO, A., BOCCADORO, M. & OMEDE, P. 2016. Multiple myeloma: New surface antigens for the characterization of plasma cells in the era of novel agents. *Cytometry B Clin Cytom*, 90, 81-90.
- NAZARI, H., ZHANG, L., ZHU, D., CHADER, G. J., FALABELLA, P., STEFANINI, F., ROWLAND, T., CLEGG, D. O., KASHANI, A. H., HINTON, D. R. & HUMAYUN, M. S. 2015. Stem cell based therapies for age-related macular degeneration: The promises and the challenges. *Prog Retin Eye Res*, 48, 1-39.
- NI, Z., KNORR, D. A., BENDZICK, L., ALLRED, J. & KAUFMAN, D. S. 2014. Expression of chimeric receptor CD4zeta by natural killer cells derived from human pluripotent stem cells improves in vitro activity but does not enhance suppression of HIV infection in vivo. *Stem Cells*, 32, 1021-31.
- NIETO-VELAZQUEZ, N. G., TORRES-RAMOS, Y. D., MUNOZ-SANCHEZ, J. L., ESPINOSA-GODOY, L., GOMEZ-CORTES, S., MORENO, J. & MORENO-EUTIMIO, M. A. 2016. Altered Expression



- of Natural Cytotoxicity Receptors and NKG2D on Peripheral Blood NK Cell Subsets in Breast Cancer Patients. *Transl Oncol*, 9, 384-391.
- NIU, C., JIN, H., LI, M., ZHU, S., ZHOU, L., JIN, F., ZHOU, Y., XU, D., XU, J., ZHAO, L., HAO, S., LI, W. & CUI, J. 2016. Low-dose bortezomib increases the expression of NKG2D and DNAM-1 ligands and enhances induced NK and gammadelta T cell-mediated lysis in multiple myeloma. *Oncotarget*.
- NOOKA, A. K., KASTRITIS, E., DIMOPOULOS, M. A. & LONIAL, S. 2015. Treatment options for relapsed and refractory multiple myeloma. *Blood*, 125, 3085-99.
- O'CONNOR, R., OOI, M. G., MEILLER, J., JAKUBIKOVA, J., KLIPPEL, S., DELMORE, J., RICHARDSON, P., ANDERSON, K., CLYNES, M., MITSIADES, C. S. & O'GORMAN, P. 2013. The interaction of bortezomib with multidrug transporters: implications for therapeutic applications in advanced multiple myeloma and other neoplasias. *Cancer Chemother Pharmacol*, 71, 1357-68.
- O'SULLIVAN, T. E. & SUN, J. C. 2015. Generation of Natural Killer Cell Memory during Viral Infection. *J Innate Immun*, 7, 557-62.
- OATES, J. E., GREY, B. R., ADDLA, S. K., SAMUEL, J. D., HART, C. A., RAMANI, V. A., BROWN, M. D. & CLARKE, N. W. 2009. Hoechst 33342 side population identification is a conserved and unified mechanism in urological cancers. *Stem Cells Dev*, 18, 1515-22.
- OCQUETEAU, M., ORFAO, A., GARCIA-SANZ, R., ALMEIDA, J., GONZALEZ, M. & SAN MIGUEL, J. F. 1996. Expression of the CD117 antigen (c-Kit) on normal and myelomatous plasma cells. *Br J Haematol*, 95, 489-93.
- ORFAO, A., GARCIA-SANZ, R., LOPEZ-BERGES, M. C., BELEN VIDRIALES, M., GONZALEZ, M., CABALLERO, M. D. & SAN MIGUEL, J. F. 1994. A new method for the analysis of plasma cell DNA content in multiple myeloma samples using a CD38/propidium iodide double staining technique. *Cytometry*, 17, 332-9.
- ORNSTEIN, B. W., HILL, E. B., GEURS, T. L. & FRENCH, A. R. 2013. Natural killer cell functional defects in pediatric patients with severe and recurrent herpesvirus infections. *J Infect Dis*, 207, 458-68.
- OYER, J. L., PANDEY, V., IGARASHI, R. Y., SOMANCHI, S. S., ZAKARI, A., SOLH, M., LEE, D. A., ALTOMARE, D. A. & COPIK, A. J. 2016. Natural killer cells stimulated with PM21 particles expand and biodistribute in vivo: Clinical implications for cancer treatment. *Cytotherapy*, 18, 653-63.
- PAINO, T., SARASQUETE, M. E., PAIVA, B., KRZEMINSKI, P., SAN-SEGUNDO, L., CORCHETE, L. A., REDONDO, A., GARAYOA, M., GARCIA-SANZ, R., GUTIERREZ, N. C., OCIO, E. M. & SAN-MIGUEL, J. F. 2014. Phenotypic, genomic and functional characterization reveals no differences between CD138++ and CD138low subpopulations in multiple myeloma cell lines. *PLoS One*, 9, e92378.
- PALUMBO, A., AVET-LOISEAU, H., OLIVA, S., LOKHORST, H. M., GOLDSCHMIDT, H., ROSINOL, L., RICHARDSON, P., CALTAGIRONE, S., LAHUERTA, J. J., FACON, T., BRINGHEN, S., GAY, F., ATTAL, M., PASSERA, R., SPENCER, A., OFFIDANI, M., KUMAR, S., MUSTO, P., LONIAL, S., PETRUCCI, M. T., ORLOWSKI, R. Z., ZAMAGNI, E., MORGAN, G., DIMOPOULOS, M. A., DURIE, B. G., ANDERSON, K. C., SONNEVELD, P., SAN MIGUEL, J., CAVO, M., RAJKUMAR, S. V. & MOREAU, P. 2015. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol*, 33, 2863-9.
- PARHAM, P. 2005. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol*, 5, 201-14.
- PARHAM, P. 2015. Co-evolution of lymphocyte receptors with MHC class I. *Immunol Rev*, 267, 1-5.
- PASCUTTI, F., CUNHA, L. L., RIZZATTI, E. G. & COLLEONI, G. W. 2013. Understanding myeloma cancer stem cells. *Immunotherapy*, 5, 1291-4.
- PAWLYN, C., MELCHOR, L., MURISON, A., WARDELL, C. P., BRIOLI, A., BOYLE, E. M., KAISER, M. F., WALKER, B. A., BEGUM, D. B., DAHIR, N. B., PROSZEK, P., GREGORY, W. M., DRAYSON,

- M. T., JACKSON, G. H., ROSS, F. M., DAVIES, F. E. & MORGAN, G. J. 2015. Coexistent hyperdiploidy does not abrogate poor prognosis in myeloma with adverse cytogenetics and may precede IGH translocations. *Blood*, 125, 831-40.
- PENA-SOLORZANO, D., STARK, S. A., KONIG, B., SIERRA, C. A. & OCHOA-PUENTES, C. 2016. ABCG2/BCRP: Specific and Nonspecific Modulators. *Med Res Rev*.
- PERUSSIA, B., RAMONI, C., ANEGON, I., CUTURI, M. C., FAUST, J. & TRINCHIERI, G. 1987. Preferential proliferation of natural killer cells among peripheral blood mononuclear cells cocultured with B lymphoblastoid cell lines. *Nat Immun Cell Growth Regul*, 6, 171-88.
- PFAFFL, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29, e45.
- PITTARI, G., FREGNI, G., ROGUET, L., GARCIA, A., VATAIRE, A. L., WITTNEBEL, S., AMSELLEM, S., CHOUAIB, S., BOURHIS, J. H. & CAIGNARD, A. 2010. Early evaluation of natural killer activity in post-transplant acute myeloid leukemia patients. *Bone Marrow Transplant*, 45, 862-71.
- PLESNER, T., ARKENAU, H. T., GIMSING, P., KREJCIK, J., LEMECH, C., MINNEMA, M. C., LASSEN, U., LAUBACH, J. P., PALUMBO, A., LISBY, S., BASSE, L., WANG, J., SASSER, A. K., GUCKERT, M. E., DE BOER, C., KHOKHAR, N. Z., YEH, H., CLEMENS, P. L., AHMADI, T., LOKHORST, H. M. & RICHARDSON, P. G. 2016. Phase 1/2 study of daratumumab, lenalidomide, and dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *Blood*.
- POJERO, F., FLORES-MONTERO, J., SANOJA, L., PEREZ, J. J., PUIG, N., PAIVA, B., BOTTCHER, S., VAN DONGEN, J. J., ORFAO, A. & EUROFLOW, G. 2016. Utility of CD54, CD229, and CD319 for the identification of plasma cells in patients with clonal plasma cell diseases. *Cytometry B Clin Cytom*, 90, 91-100.
- PRATT, G., GOODYEAR, O. & MOSS, P. 2007. Immunodeficiency and immunotherapy in multiple myeloma. *Br J Haematol*, 138, 563-79.
- PRUD'HOMME, G. J. 2012. Cancer stem cells and novel targets for antitumor strategies. *Curr Pharm Des*, 18, 2838-49.
- QI, Y. Y., ZHOU, X. J., CHENG, F. J. & ZHANG, H. 2016. Elevated Plasma alpha-Defensins (HNP1-3) Levels Correlated with IgA1 Glycosylation and Susceptibility to IgA Nephropathy. *Dis Markers*, 2016, 8123138.
- QUARONA, V., ZACCARELLO, G., CHILLEMI, A., BRUNETTI, E., SINGH, V. K., FERRERO, E., FUNARO, A., HORENSTEIN, A. L. & MALAVASI, F. 2013. CD38 and CD157: a long journey from activation markers to multifunctional molecules. *Cytometry B Clin Cytom*, 84, 207-17.
- QUIJANO, S., LOPEZ, A., RASILLO, A., BARRENA, S., LUZ SANCHEZ, M., FLORES, J., FERNANDEZ, C., SAYAGUES, J. M., OSUNA, C. S., FERNANDEZ, N., GONZALEZ, M., GIRALDO, P., GIRALT, M., PEREZ, M. C., MARTIN-ANTORAN, J. M., GUTIERREZ, O., PERDIGUER, L., DIAZ MEDIAVILLA, J., GONZALEZ SILVA, M., ASENSIO DEL RIO, A., CERVERO, C., GUERRA, J. L., BUTRON, R., GARCIA MDEL, C., ALMEIDA, J. & ORFAO, A. 2008. Association between the proliferative rate of neoplastic B cells, their maturation stage, and underlying cytogenetic abnormalities in B-cell chronic lymphoproliferative disorders: analysis of a series of 432 patients. *Blood*, 111, 5130-41.
- RAJKUMAR, S. V. & KYLE, R. A. 2005. Multiple myeloma: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc*, 80, 1371-82.
- RALAINIRINA, N., POLI, A., MICHEL, T., POOS, L., ANDRES, E., HENTGES, F. & ZIMMER, J. 2007. Control of NK cell functions by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Leukoc Biol*, 81, 144-53.
- RATTA, M., FAGNONI, F., CURTI, A., VESCOVINI, R., SANSONI, P., OLIVIERO, B., FOGLI, M., FERRI, E., DELLA CUNA, G. R., TURA, S., BACCARANI, M. & LEMOLI, R. M. 2002. Dendritic cells are functionally defective in multiple myeloma: the role of interleukin-6. *Blood*, 100, 230-7.
- RAULET, D. H. 2003. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol*, 3, 781-90.

- RAWSTRON, A. C., DAVIES, F. E., OWEN, R. G., ENGLISH, A., PRATT, G., CHILD, J. A., JACK, A. S. & MORGAN, G. J. 1998. B-lymphocyte suppression in multiple myeloma is a reversible phenomenon specific to normal B-cell progenitors and plasma cell precursors. *Br J Haematol*, 100, 176-83.
- REAGAN, M. R. & ROSEN, C. J. 2016. Navigating the bone marrow niche: translational insights and cancer-driven dysfunction. *Nat Rev Rheumatol*, 12, 154-68.
- REICHARDT, V. L., OKADA, C. Y., LISO, A., BENIKE, C. J., STOCKERL-GOLDSTEIN, K. E., ENGLEMAN, E. G., BLUME, K. G. & LEVY, R. 1999. Idiotype vaccination using dendritic cells after autologous peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma--a feasibility study. *Blood*, 93, 2411-9.
- RIZ, I., HAWLEY, T. S., MARSAL, J. W. & HAWLEY, R. G. 2016. Noncanonical SQSTM1/p62-Nrf2 pathway activation mediates proteasome inhibitor resistance in multiple myeloma cells via redox, metabolic and translational reprogramming. *Oncotarget*, 7, 66360-66385.
- ROBILLARD, N., JEGO, G., PELLAT-DECEUNYNCK, C., PINEAU, D., PUTHIER, D., MELLERIN, M. P., BARILLE, S., RAPP, M. J., HAROUSSEAU, J. L., AMIOT, M. & BATAILLE, R. 1998. CD28, a marker associated with tumoral expansion in multiple myeloma. *Clin Cancer Res*, 4, 1521-6.
- ROCCA, Y. S., ROBERTI, M. P., ARRIAGA, J. M., AMAT, M., BRUNO, L., PAMPENA, M. B., HUERTAS, E., LORIA, F. S., PAIROLA, A., BIANCHINI, M., MORDOH, J. & LEVY, E. M. 2013. Altered phenotype in peripheral blood and tumor-associated NK cells from colorectal cancer patients. *Innate Immun*, 19, 76-85.
- ROCCA, Y. S., ROBERTI, M. P., JULIA, E. P., PAMPENA, M. B., BRUNO, L., RIVERO, S., HUERTAS, E., SANCHEZ LORIA, F., PAIROLA, A., CAIGNARD, A., MORDOH, J. & LEVY, E. M. 2016. Phenotypic and Functional Dysregulated Blood NK Cells in Colorectal Cancer Patients Can Be Activated by Cetuximab Plus IL-2 or IL-15. *Front Immunol*, 7, 413.
- ROCCARO, A. M., SACCO, A., MAISO, P., AZAB, A. K., TAI, Y. T., REAGAN, M., AZAB, F., FLORES, L. M., CAMPIGOTTO, F., WELLER, E., ANDERSON, K. C., SCADDEN, D. T. & GHOBRIAL, I. M. 2013. BM mesenchymal stromal cell-derived exosomes facilitate multiple myeloma progression. *J Clin Invest*, 123, 1542-55.
- ROLLIG, C., KNOP, S. & BORNHAUSER, M. 2015. Multiple myeloma. *Lancet*, 385, 2197-208.
- ROLLIG, C., SCHMIDT, C., BORNHAUSER, M., EHNINGER, G., SCHMITZ, M. & AUFFERMANN-GRETZINGER, S. 2011. Induction of cellular immune responses in patients with stage-I multiple myeloma after vaccination with autologous idiotype-pulsed dendritic cells. *J Immunother*, 34, 100-6.
- ROODMAN, G. D. & DOUGALL, W. C. 2008. RANK ligand as a therapeutic target for bone metastases and multiple myeloma. *Cancer Treat Rev*, 34, 92-101.
- ROSENBLATT, J. & AVIGAN, D. 2015. Role of Immune Therapies for Myeloma. *J Natl Compr Canc Netw*, 13, 1440-7.
- ROSENBLATT, J., AVIVI, I., VASIR, B., UHL, L., MUNSHI, N. C., KATZ, T., DEY, B. R., SOMAIYA, P., MILLS, H., CAMPIGOTTO, F., WELLER, E., JOYCE, R., LEVINE, J. D., TZACHANIS, D., RICHARDSON, P., LAUBACH, J., RAJE, N., BOUSSIOTIS, V., YUAN, Y. E., BISHARAT, L., HELD, V., ROWE, J., ANDERSON, K., KUFU, D. & AVIGAN, D. 2013. Vaccination with dendritic cell/tumor fusions following autologous stem cell transplant induces immunologic and clinical responses in multiple myeloma patients. *Clin Cancer Res*, 19, 3640-8.
- ROSENBLATT, J., BAR-NATAN, M., MUNSHI, N. C. & AVIGAN, D. E. 2014. Immunotherapy for multiple myeloma. *Expert Rev Hematol*, 7, 91-6.
- ROSENBLATT, J., VASIR, B., UHL, L., BLOTTA, S., MACNAMARA, C., SOMAIYA, P., WU, Z., JOYCE, R., LEVINE, J. D., DOMBAGODA, D., YUAN, Y. E., FRANCOEUR, K., FITZGERALD, D., RICHARDSON, P., WELLER, E., ANDERSON, K., KUFU, D., MUNSHI, N. & AVIGAN, D. 2011. Vaccination with dendritic cell/tumor fusion cells results in cellular and humoral antitumor immune responses in patients with multiple myeloma. *Blood*, 117, 393-402.

- RUIZ-ARGUELLES, G. J. & SAN MIGUEL, J. F. 1994. Cell surface markers in multiple myeloma. *Mayo Clin Proc*, 69, 684-90.
- SAHM, C., SCHONFELD, K. & WELS, W. S. 2012. Expression of IL-15 in NK cells results in rapid enrichment and selective cytotoxicity of gene-modified effectors that carry a tumor-specific antigen receptor. *Cancer Immunol Immunother*, 61, 1451-61.
- SAKISAKA, T. & TAKAI, Y. 2004. Biology and pathology of nectins and nectin-like molecules. *Curr Opin Cell Biol*, 16, 513-21.
- SALVINI, M., BONELLO, F., BOCCADORO, M. & LAROCCA, A. 2017. Management of adverse events induced by next-generation immunomodulatory drug and proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Expert Rev Anticancer Ther*, 17, 75-87.
- SAN MIGUEL, J., WEISEL, K., MOREAU, P., LACY, M., SONG, K., DELFORGE, M., KARLIN, L., GOLDSCHMIDT, H., BANOS, A., ORIOL, A., ALEGRE, A., CHEN, C., CAVO, M., GARDERET, L., IVANOVA, V., MARTINEZ-LOPEZ, J., BELCH, A., PALUMBO, A., SCHEY, S., SONNEVELD, P., YU, X., STERNAS, L., JACQUES, C., ZAKI, M. & DIMOPOULOS, M. 2013. Pomalidomide plus low-dose dexamethasone versus high-dose dexamethasone alone for patients with relapsed and refractory multiple myeloma (MM-003): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 14, 1055-66.
- SANCHEZ, R. A. 1995. Water quality problems in Nogales, Sonora. *Environ Health Perspect*, 103 Suppl 1, 93-7.
- SCONOCCHIA, G., ZLOBEC, I., LUGLI, A., CALABRESE, D., IEZZI, G., KARAMITOPOULOU, E., PATSOURIS, E. S., PEROS, G., HORCIC, M., TORNILLO, L., ZUBER, M., DROESER, R., MURARO, M. G., MENGUS, C., OERTLI, D., FERRONE, S., TERRACCIANO, L. & SPAGNOLI, G. C. 2011. Tumor infiltration by FcγRIII (CD16)+ myeloid cells is associated with improved survival in patients with colorectal carcinoma. *Int J Cancer*, 128, 2663-72.
- SCHINDELIN, J., ARGANDA-CARRERAS, I., FRISE, E., KAYNIG, V., LONGAIR, M., PIETZSCH, T., PREIBISCH, S., RUEDEN, C., SAALFELD, S., SCHMID, B., TINEVEZ, J. Y., WHITE, D. J., HARTENSTEIN, V., ELICEIRI, K., TOMANCAK, P. & CARDONA, A. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*, 9, 676-82.
- SCHLUMS, H., CICHOCKI, F., TESI, B., THEORELL, J., BEZIAT, V., HOLMES, T. D., HAN, H., CHIANG, S. C., FOLEY, B., MATTSSON, K., LARSSON, S., SCHAFFER, M., MALMBERG, K. J., LJUNGGREN, H. G., MILLER, J. S. & BRYCESON, Y. T. 2015. Cytomegalovirus infection drives adaptive epigenetic diversification of NK cells with altered signaling and effector function. *Immunity*, 42, 443-56.
- SCHMIDT-WOLF, I. G., NEGRIN, R. S., KIEM, H. P., BLUME, K. G. & WEISSMAN, I. L. 1991. Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity. *J Exp Med*, 174, 139-49.
- SCHNEIDER, C. A., RASBAND, W. S. & ELICEIRI, K. W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*, 9, 671-5.
- SCHONFELD, K., SAHM, C., ZHANG, C., NAUNDORF, S., BRENDDEL, C., ODENDAHL, M., NOWAKOWSKA, P., BONIG, H., KOHL, U., KLOESS, S., KOHLER, S., HOLTGREVE-GREZ, H., JAUCH, A., SCHMIDT, M., SCHUBERT, R., KUHLCHE, K., SEIFRIED, E., KLINGEMANN, H. G., RIEGER, M. A., TONN, T., GREZ, M. & WELS, W. S. 2015. Selective inhibition of tumor growth by clonal NK cells expressing an ErbB2/HER2-specific chimeric antigen receptor. *Mol Ther*, 23, 330-8.
- SCHULTZ-CHERRY, S. 2015. Role of NK cells in influenza infection. *Curr Top Microbiol Immunol*, 386, 109-20.
- SCHULL, W. J. 1983. Late radiation responses in man: current evaluation from results from Hiroshima and Nagasaki. *Adv Space Res*, 3, 231-9.
- SCHUTT, P., BRANDHORST, D., STELLBERG, W., POSER, M., EBELING, P., MULLER, S., BUTTKEREIT, U., OPALKA, B., LINDEMANN, M., GROSSE-WILDE, H., SEEGER, S., MORITZ, T. & NOWROUSIAN, M. R. 2006. Immune parameters in multiple myeloma patients:

- influence of treatment and correlation with opportunistic infections. *Leuk Lymphoma*, 47, 1570-82.
- SENTMAN, M. L., MURAD, J. M., COOK, W. J., WU, M. R., REDER, J., BAUMEISTER, S. H., DRANOFF, G., FANGER, M. W. & SENTMAN, C. L. 2016. Mechanisms of Acute Toxicity in NKG2D Chimeric Antigen Receptor T Cell-Treated Mice. *J Immunol*, 197, 4674-4685.
- SHABRISH, S., GUPTA, M. & MADKAIKAR, M. 2016. A Modified NK Cell Degranulation Assay Applicable for Routine Evaluation of NK Cell Function. *J Immunol Res*, 2016, 3769590.
- SHAKER, M. A. & YOUNES, H. M. 2009. Interleukin-2: evaluation of routes of administration and current delivery systems in cancer therapy. *J Pharm Sci*, 98, 2268-98.
- SHI, J., TRICOT, G., SZMANIA, S., ROSEN, N., GARG, T. K., MALAVIARACHCHI, P. A., MORENO, A., DUPONT, B., HSU, K. C., BAXTER-LOWE, L. A., COTTLER-FOX, M., SHAUGHNESSY, J. D., JR., BARLOGIE, B. & VAN RHEE, F. 2008a. Infusion of haplo-identical killer immunoglobulin-like receptor ligand mismatched NK cells for relapsed myeloma in the setting of autologous stem cell transplantation. *Br J Haematol*, 143, 641-53.
- SHI, J., TRICOT, G. J., GARG, T. K., MALAVIARACHCHI, P. A., SZMANIA, S. M., KELLUM, R. E., STORRIE, B., MULDER, A., SHAUGHNESSY, J. D., JR., BARLOGIE, B. & VAN RHEE, F. 2008b. Bortezomib down-regulates the cell-surface expression of HLA class I and enhances natural killer cell-mediated lysis of myeloma. *Blood*, 111, 1309-17.
- SHIMASAKI, N., COUSTAN-SMITH, E., KAMIYA, T. & CAMPANA, D. 2016. Expanded and armed natural killer cells for cancer treatment. *Cytotherapy*, 18, 1422-1434.
- SHIMIZU, Y., KATO, H. & SCHULL, W. J. 1990. Studies of the mortality of A-bomb survivors. 9. Mortality, 1950-1985: Part 2. Cancer mortality based on the recently revised doses (DS86). *Radiat Res*, 121, 120-41.
- SIEGLER, U., MEYER-MONARD, S., JORGER, S., STERN, M., TICHELLI, A., GRATWOHL, A., WODNAR-FILIPOWICZ, A. & KALBERER, C. P. 2010. Good manufacturing practice-compliant cell sorting and large-scale expansion of single KIR-positive alloreactive human natural killer cells for multiple infusions to leukemia patients. *Cytotherapy*, 12, 750-63.
- SIGNORI, E., IURESCIA, S., MASSI, E., FIORETTI, D., CHIARELLA, P., DE ROBERTIS, M., RINALDI, M., TONON, G. & FAZIO, V. M. 2010. DNA vaccination strategies for anti-tumour effective gene therapy protocols. *Cancer Immunol Immunother*, 59, 1583-91.
- SINGH, H., MANURI, P. R., OLIVARES, S., DARA, N., DAWSON, M. J., HULS, H., HACKETT, P. B., KOHN, D. B., SHPALL, E. J., CHAMPLIN, R. E. & COOPER, L. J. 2008. Redirecting specificity of T-cell populations for CD19 using the Sleeping Beauty system. *Cancer Res*, 68, 2961-71.
- SKEATE, R., SINGH, C., COOLEY, S., GELLER, M., NORTHOUSE, J., WELBIG, J., SLUNGAARD, A., MILLER, J. & MCKENNA, D. 2013. Hemolytic anemia due to passenger lymphocyte syndrome in solid malignancy patients treated with allogeneic natural killer cell products. *Transfusion*, 53, 419-23.
- SKROMBOLAS, D. & FRELINGER, J. G. 2014. Challenges and developing solutions for increasing the benefits of IL-2 treatment in tumor therapy. *Expert Rev Clin Immunol*, 10, 207-17.
- SMITH, D. & YONG, K. 2016. Advances in understanding prognosis in myeloma. *Br J Haematol*, 175, 367-380.
- SMYTH, M. J., HAYAKAWA, Y., TAKEDA, K. & YAGITA, H. 2002. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer*, 2, 850-61.
- SMYTH, M. J., TENG, M. W., SWANN, J., KYPARISSOUDIS, K., GODFREY, D. I. & HAYAKAWA, Y. 2006. CD4+CD25+ T regulatory cells suppress NK cell-mediated immunotherapy of cancer. *J Immunol*, 176, 1582-7.
- SOMANCHI, S. S., SOMANCHI, A., COOPER, L. J. & LEE, D. A. 2012. Engineering lymph node homing of ex vivo-expanded human natural killer cells via trogocytosis of the chemokine receptor CCR7. *Blood*, 119, 5164-72.

- SONG, D. G., YE, Q., SANTORO, S., FANG, C., BEST, A. & POWELL, D. J., JR. 2013. Chimeric NKG2D CAR-expressing T cell-mediated attack of human ovarian cancer is enhanced by histone deacetylase inhibition. *Hum Gene Ther*, 24, 295-305.
- SORIANI, A., FIONDA, C., RICCI, B., IANNITTO, M. L., CIPPITELLI, M. & SANTONI, A. 2013. Chemotherapy-elicited upregulation of NKG2D and DNAM-1 ligands as a therapeutic target in multiple myeloma. *Oncoimmunology*, 2, e26663.
- SORIANI, A., ZINGONI, A., CERBONI, C., IANNITTO, M. L., RICCIARDI, M. R., DI GIALLEONARDO, V., CIPPITELLI, M., FIONDA, C., PETRUCCI, M. T., GUARINI, A., FOA, R. & SANTONI, A. 2009. ATM-ATR-dependent up-regulation of DNAM-1 and NKG2D ligands on multiple myeloma cells by therapeutic agents results in enhanced NK-cell susceptibility and is associated with a senescent phenotype. *Blood*, 113, 3503-11.
- ST CROIX, B., FLORENES, V. A., RAK, J. W., FLANAGAN, M., BHATTACHARYA, N., SLINGERLAND, J. M. & KERBEL, R. S. 1996. Impact of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 on resistance of tumor cells to anticancer agents. *Nat Med*, 2, 1204-10.
- STEVENS, W. B., NETEA, M. G., KATER, A. P. & VAN DER VELDEN, W. J. 2016. 'Trained immunity': consequences for lymphoid malignancies. *Haematologica*, 101, 1460-1468.
- SUCK, G., ODENDAHL, M., NOWAKOWSKA, P., SEIDL, C., WELS, W. S., KLINGEMANN, H. G. & TONN, T. 2016. NK-92: an 'off-the-shelf therapeutic' for adoptive natural killer cell-based cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*, 65, 485-92.
- SUTLU, T. & ALICI, E. 2009. Natural killer cell-based immunotherapy in cancer: current insights and future prospects. *J Intern Med*, 266, 154-81.
- SUTLU, T., STELLAN, B., GILLJAM, M., QUEZADA, H. C., NAHI, H., GAHRTON, G. & ALICI, E. 2010. Clinical-grade, large-scale, feeder-free expansion of highly active human natural killer cells for adoptive immunotherapy using an automated bioreactor. *Cytotherapy*, 12, 1044-55.
- SWIFT, B. E., WILLIAMS, B. A., KOSAKA, Y., WANG, X. H., MEDIN, J. A., VISWANATHAN, S., MARTINEZ-LOPEZ, J. & KEATING, A. 2012. Natural killer cell lines preferentially kill clonogenic multiple myeloma cells and decrease myeloma engraftment in a bioluminescent xenograft mouse model. *Haematologica*, 97, 1020-8.
- SZCZEPEK, A. J., SEEBERGER, K., WIZNIAK, J., MANT, M. J., BELCH, A. R. & PILARSKI, L. M. 1998. A high frequency of circulating B cells share clonotypic Ig heavy-chain VDJ rearrangements with autologous bone marrow plasma cells in multiple myeloma, as measured by single-cell and in situ reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Blood*, 92, 2844-55.
- SZMANIA, S., LAPTEVA, N., GARG, T., GREENWAY, A., LINGO, J., NAIR, B., STONE, K., WOODS, E., KHAN, J., STIVERS, J., PANOZZO, S., CAMPANA, D., BELLAMY, W. T., ROBBINS, M., EPSTEIN, J., YACCOBY, S., WAHEED, S., GEE, A., COTTLER-FOX, M., ROONEY, C., BARLOGIE, B. & VAN RHEE, F. 2015. Ex vivo-expanded natural killer cells demonstrate robust proliferation in vivo in high-risk relapsed multiple myeloma patients. *J Immunother*, 38, 24-36.
- SZOLOMAJER-CSIKOS, O., BEERY, E., KOSA, L., RAJNAI, Z., JANI, M., HETENYI, A., JAKAB, K. T., KRAJCSI, P. & TOTH, G. K. 2013. Synthesis and ABCG2 inhibitory activity of novel fumitremorgin C analogs--specificity and structure activity correlations. *Med Chem*, 9, 494-509.
- TAI, Y. T., SOYDAN, E., SONG, W., FULCINITI, M., KIM, K., HONG, F., LI, X. F., BURGER, P., RUMIZEN, M. J., NAHAR, S., PODAR, K., HIDESHIMA, T., MUNSHI, N. C., TONON, G., CARRASCO, R. D., AFAR, D. E. & ANDERSON, K. C. 2009. CS1 promotes multiple myeloma cell adhesion, clonogenic growth, and tumorigenicity via c-maf-mediated interactions with bone marrow stromal cells. *Blood*, 113, 4309-18.
- TAKAHASHI, T., KAWAI, T., USHIKOSHI, H., NAGANO, S., OSHIKA, H., INOUE, M., KUNISADA, T., TAKEMURA, G., FUJIWARA, H. & KOSAI, K. 2006. Identification and isolation of embryonic stem cell-derived target cells by adenoviral conditional targeting. *Mol Ther*, 14, 673-83.

- TAKAISHI, S., OKUMURA, T., TU, S., WANG, S. S., SHIBATA, W., VIGNESHWARAN, R., GORDON, S. A., SHIMADA, Y. & WANG, T. C. 2009. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells*, 27, 1006-20.
- TAM, Y. K., MARTINSON, J. A., DOLIGOSA, K. & KLINGEMANN, H. G. 2003. Ex vivo expansion of the highly cytotoxic human natural killer-92 cell-line under current good manufacturing practice conditions for clinical adoptive cellular immunotherapy. *Cytotherapy*, 5, 259-72.
- TANNO, T., LIM, Y., WANG, Q., CHESI, M., BERGSAGEL, P. L., MATTHEWS, G., JOHNSTONE, R. W., GHOSH, N., BORRELLO, I., HUFF, C. A. & MATSUI, W. 2014. Growth differentiating factor 15 enhances the tumor-initiating and self-renewal potential of multiple myeloma cells. *Blood*, 123, 725-33.
- TARTE, K., DE VOS, J., THYKJAER, T., ZHAN, F., FIOL, G., COSTES, V., REME, T., LEGOUFFE, E., ROSSI, J. F., SHAUGHNESSY, J., JR., ORNTOT, T. F. & KLEIN, B. 2002. Generation of polyclonal plasmablasts from peripheral blood B cells: a normal counterpart of malignant plasmablasts. *Blood*, 100, 1113-22.
- TASSEV, D. V., CHENG, M. & CHEUNG, N. K. 2012. Retargeting NK92 cells using an HLA-A2-restricted, EBNA3C-specific chimeric antigen receptor. *Cancer Gene Ther*, 19, 84-100.
- TELFORD, W. G. 2013. Stem cell identification by DyeCycle Violet side population analysis. *Methods Mol Biol*, 946, 163-79.
- TEOH, G. & ANDERSON, K. C. 1997. Interaction of tumor and host cells with adhesion and extracellular matrix molecules in the development of multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am*, 11, 27-42.
- THOMSON, J. A., ITSKOVITZ-ELDOR, J., SHAPIRO, S. S., WAKNITZ, M. A., SWIERGIEL, J. J., MARSHALL, V. S. & JONES, J. M. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282, 1145-7.
- TONG, Z., YERRAMILI, U., SURAPANENI, S. & KUMAR, G. 2014. The interactions of lenalidomide with human uptake and efflux transporters and UDP-glucuronosyltransferase 1A1: lack of potential for drug-drug interactions. *Cancer Chemother Pharmacol*, 73, 869-74.
- TRAPANI, J. A., DAVIS, J., SUTTON, V. R. & SMYTH, M. J. 2000. Proapoptotic functions of cytotoxic lymphocyte granule constituents in vitro and in vivo. *Curr Opin Immunol*, 12, 323-9.
- USMANI, S. Z. & LONIAL, S. 2014. Novel drug combinations for the management of relapsed/refractory multiple myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 14 Suppl, S71-7.
- VALKOVIC, T., GACIC, V., IVANDIC, J., PETROV, B., DOBRILA-DINTINJANA, R., DADIC-HERO, E. & NACINOVIC-DULETIC, A. 2015. Infections in Hospitalised Patients with Multiple Myeloma: Main Characteristics and Risk Factors. *Turk J Haematol*, 32, 234-42.
- VAN CAMP, B., DURIE, B. G., SPIER, C., DE WAELE, M., VAN RIET, I., VELA, E., FRUTIGER, Y., RICHTER, L. & GROGAN, T. M. 1990. Plasma cells in multiple myeloma express a natural killer cell-associated antigen: CD56 (NKH-1; Leu-19). *Blood*, 76, 377-82.
- VAN DEN BERG, J. H., GOMEZ-EERLAND, R., VAN DE WIEL, B., HULSHOFF, L., VAN DEN BROEK, D., BINS, A., TAN, H. L., HARPER, J. V., HASSAN, N. J., JAKOBSEN, B. K., JORRITSMA, A., BLANK, C. U., SCHUMACHER, T. N. & HAANEN, J. B. 2015. Case Report of a Fatal Serious Adverse Event Upon Administration of T Cells Transduced With a MART-1-specific T-cell Receptor. *Mol Ther*, 23, 1541-50.
- VAN RIET, I., DE WAELE, M., REMELS, L., LACOR, P., SCHOTS, R. & VAN CAMP, B. 1991. Expression of cytoadhesion molecules (CD56, CD54, CD18 and CD29) by myeloma plasma cells. *Br J Haematol*, 79, 421-7.
- VASIR, B., BORGES, V., WU, Z., GROSMAN, D., ROSENBLATT, J., IRIE, M., ANDERSON, K., KUFE, D. & AVIGAN, D. 2005. Fusion of dendritic cells with multiple myeloma cells results in maturation and enhanced antigen presentation. *Br J Haematol*, 129, 687-700.
- VEILLETTE, A. 2006. NK cell regulation by SLAM family receptors and SAP-related adapters. *Immunol Rev*, 214, 22-34.

- VIEL, S., CHARRIER, E., MARCAIS, A., ROUZAIRE, P., BIENVENU, J., KARLIN, L., SALLES, G. & WALZER, T. 2013. Monitoring NK cell activity in patients with hematological malignancies. *Oncoimmunology*, 2, e26011.
- VILLEGAS, F. R., COCA, S., VILLARRUBIA, V. G., JIMENEZ, R., CHILLON, M. J., JARENO, J., ZUIL, M. & CALLOL, L. 2002. Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer*, 35, 23-8.
- VIVIER, E., RAULET, D. H., MORETTA, A., CALIGIURI, M. A., ZITVOGEL, L., LANIER, L. L., YOKOYAMA, W. M. & UGOLINI, S. 2011. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*, 331, 44-9.
- VIVIER, E., TOMASELLO, E., BARATIN, M., WALZER, T. & UGOLINI, S. 2008. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*, 9, 503-10.
- VON LILIENFELD-TOAL, M., FRANK, S., LEYENDECKER, C., FEYLER, S., JARMIN, S., MORGAN, R., GLASMACHER, A., MARTEN, A., SCHMIDT-WOLF, I. G., BROSSART, P. & COOK, G. 2010. Reduced immune effector cell NKG2D expression and increased levels of soluble NKG2D ligands in multiple myeloma may not be causally linked. *Cancer Immunol Immunother*, 59, 829-39.
- WAJANT, H. 2006. CD95L/FasL and TRAIL in tumour surveillance and cancer therapy. *Cancer Treat Res*, 130, 141-65.
- WAJANT, H. 2015. Principles of antibody-mediated TNF receptor activation. *Cell Death Differ*, 22, 1727-41.
- WALKER, B. A., LEONE, P. E., CHIECCHIO, L., DICKENS, N. J., JENNER, M. W., BOYD, K. D., JOHNSON, D. C., GONZALEZ, D., DAGRADA, G. P., PROTHEROE, R. K., KONN, Z. J., STOCKLEY, D. M., GREGORY, W. M., DAVIES, F. E., ROSS, F. M. & MORGAN, G. J. 2010. A compendium of myeloma-associated chromosomal copy number abnormalities and their prognostic value. *Blood*, 116, e56-65.
- WANG, M. L., CHIOU, S. H. & WU, C. W. 2013a. Targeting cancer stem cells: emerging role of Nanog transcription factor. *Onco Targets Ther*, 6, 1207-20.
- WANG, X., LEE, D. A., WANG, Y., WANG, L., YAO, Y., LIN, Z., CHENG, J. & ZHU, S. 2013b. Membrane-bound interleukin-21 and CD137 ligand induce functional human natural killer cells from peripheral blood mononuclear cells through STAT-3 activation. *Clin Exp Immunol*, 172, 104-12.
- WANG, X., OTTOSSON, A., JI, C., FENG, X., NORDENSKJOLD, M., HENTER, J. I., FADEEL, B. & ZHENG, C. 2009. Proteasome inhibition induces apoptosis in primary human natural killer cells and suppresses Nkp46-mediated cytotoxicity. *Haematologica*, 94, 470-8.
- WATZL, C. & LONG, E. O. 2010. Signal transduction during activation and inhibition of natural killer cells. *Curr Protoc Immunol*, Chapter 11, Unit 11 9B.
- WEI, F., RONG, X. X., XIE, R. Y., JIA, L. T., WANG, H. Y., QIN, Y. J., CHEN, L., SHEN, H. F., LIN, X. L., YANG, J., YANG, S., HAO, W. C., CHEN, Y., XIAO, S. J., ZHOU, H. R., LIN, T. Y., CHEN, Y. S., SUN, Y., YAO, K. T. & XIAO, D. 2015. Cytokine-induced killer cells efficiently kill stem-like cancer cells of nasopharyngeal carcinoma via the NKG2D-ligands recognition. *Oncotarget*, 6, 35023-39.
- WIJDENES, J., VOOIJS, W. C., CLEMENT, C., POST, J., MORARD, F., VITA, N., LAURENT, P., SUN, R. X., KLEIN, B. & DORE, J. M. 1996. A plasmacyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *Br J Haematol*, 94, 318-23.
- WILLIAMS, B. A., WANG, X. H. & KEATING, A. 2010. Clonogenic assays measure leukemia stem cell killing not detectable by chromium release and flow cytometric cytotoxicity assays. *Cytotherapy*, 12, 951-60.
- WU, D., GUO, X., SU, J., CHEN, R., BERENZON, D., GUTHOLD, M., BONIN, K., ZHAO, W. & ZHOU, X. 2015. CD138-negative myeloma cells regulate mechanical properties of bone marrow stromal cells through SDF-1/CXCR4/AKT signaling pathway. *Biochim Biophys Acta*, 1853, 338-47.



- YAN, W., DU, J., DU, Y., PU, H., LIU, S., HE, J., ZHANG, J. & HOU, J. 2016. Fenretinide targets the side population in myeloma cell line NCI-H929 and potentiates the efficacy of antimyeloma with bortezomib and dexamethasone regimen. *Leuk Res*, 51, 32-40.
- YANG, C., XIONG, F., DOU, J., XUE, J., ZHAN, X., SHI, F., LI, M., WU, S., LUO, S., ZHANG, T., ZHANG, Y., MING, J. & GU, N. 2015. Target therapy of multiple myeloma by PTX-NPs and ABCG2 antibody in a mouse xenograft model. *Oncotarget*, 6, 27714-24.
- YANG, C., XIONG, F., WANG, J., DOU, J., CHEN, J., CHEN, D., ZHANG, Y., LUO, S. & GU, N. 2014. Anti-ABCG2 monoclonal antibody in combination with paclitaxel nanoparticles against cancer stem-like cell activity in multiple myeloma. *Nanomedicine (Lond)*, 9, 45-60.
- YANG, D. H., KIM, M. H., HONG, C. Y., LEE, Y. K., JIN, C. J., PHAM, T. N., AHN, J. S., BAE, W. K., KIM, Y. K., CHUNG, I. J., KIM, H. J., KALINSKI, P. & LEE, J. J. 2010. Alpha-type 1-polarized dendritic cells loaded with apoptotic allogeneic myeloma cell line induce strong CTL responses against autologous myeloma cells. *Ann Hematol*, 89, 795-801.
- YANG, J. C., SHERRY, R. M., STEINBERG, S. M., TOPALIAN, S. L., SCHWARTZENTRUBER, D. J., HWU, P., SEIPP, C. A., ROGERS-FREEZER, L., MORTON, K. E., WHITE, D. E., LIEWEHR, D. J., MERINO, M. J. & ROSENBERG, S. A. 2003a. Randomized study of high-dose and low-dose interleukin-2 in patients with metastatic renal cancer. *J Clin Oncol*, 21, 3127-32.
- YANG, Y., BORSET, M., LANGFORD, J. K. & SANDERSON, R. D. 2003b. Heparan sulfate regulates targeting of syndecan-1 to a functional domain on the cell surface. *J Biol Chem*, 278, 12888-93.
- YANG, Y., KITAGAKI, J., WANG, H., HOU, D. X. & PERANTONI, A. O. 2009. Targeting the ubiquitin-proteasome system for cancer therapy. *Cancer Sci*, 100, 24-8.
- YAWATA, M., YAWATA, N., DRAGHI, M., LITTLE, A. M., PARTHENIOU, F. & PARHAM, P. 2006. Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J Exp Med*, 203, 633-45.
- YI, Q., SZMANIA, S., FREEMAN, J., QIAN, J., ROSEN, N. A., VISWAMITRA, S., COTTLER-FOX, M., BARLOGIE, B., TRICOT, G. & VAN RHEE, F. 2010. Optimizing dendritic cell-based immunotherapy in multiple myeloma: intranodal injections of idiotype-pulsed CD40 ligand-matured vaccines led to induction of type-1 and cytotoxic T-cell immune responses in patients. *Br J Haematol*, 150, 554-64.
- YIN, T., WANG, G., HE, S., LIU, Q., SUN, J. & WANG, Y. 2016. Human cancer cells with stem cell-like phenotype exhibit enhanced sensitivity to the cytotoxicity of IL-2 and IL-15 activated natural killer cells. *Cell Immunol*, 300, 41-5.
- YOO, E. H., KIM, H. J., LEE, S. T., KIM, W. S. & KIM, S. H. 2009. Frequent CD7 antigen loss in aggressive natural killer-cell leukemia: a useful diagnostic marker. *Korean J Lab Med*, 29, 491-6.
- ZAGOURI, F., TERPOS, E., KASTRITIS, E. & DIMOPOULOS, M. A. 2016. Emerging antibodies for the treatment of multiple myeloma. *Expert Opin Emerg Drugs*, 21, 225-37.
- ZHANG, Z., SU, T., HE, L., WANG, H., JI, G., LIU, X., ZHANG, Y. & DONG, G. 2012. Identification and functional analysis of ligands for natural killer cell activating receptors in colon carcinoma. *Tohoku J Exp Med*, 226, 59-68.
- ZHU, Y. X., BRAGGIO, E., SHI, C. X., BRUINS, L. A., SCHMIDT, J. E., VAN WIER, S., CHANG, X. B., BJORKLUND, C. C., FONSECA, R., BERGSAGEL, P. L., ORLOWSKI, R. Z. & STEWART, A. K. 2011. Cereblon expression is required for the antimyeloma activity of lenalidomide and pomalidomide. *Blood*, 118, 4771-9.

// Anexo I



## Novel treatment strategy with autologous activated and expanded natural killer cells plus anti-myeloma drugs for multiple myeloma

Alejandra Leivas<sup>a,b,\*</sup>, Antonio Perez-Martinez<sup>c</sup>, María Jesús Blanchard<sup>d</sup>, Estela Martín-Clavero<sup>a</sup>, Lucía Fernández<sup>b</sup>, Juan José Lahuerta<sup>a</sup>, and Joaquín Martínez-López<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Hematology Department, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain; <sup>b</sup>H120-CNIO Haematological Malignancies Clinical Research Unit, Spanish National Cancer Research Center, Madrid, Spain; <sup>c</sup>Pediatrics Department, Hospital la Paz, Madrid, Spain; <sup>d</sup>Hematology Department, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain

### ABSTRACT

This proof-of-concept single-arm open-label phase I clinical trial (NCT02481934) studied the safety and efficacy of multiple infusions of activated and expanded natural killer (NKAE) cells in combination with anti-myeloma drugs in multiple myeloma patients. It included five patients with relapsed or refractory MM who had received two to seven prior lines of therapy; NK cells were expanded for 3 weeks with K562-mb15-41BBL cells. Patients received four cycles of pharmacological treatment with two infusions of  $7.5 \times 10^6$  NKAEs/kg per cycle. NKAE generation, expansion, and NK monitoring was assessed using flow cytometry. Eighteen clinical-grade NKAE cell GMP-grade products were generated to obtain  $627 \times 10^6$  NKAEs (range:  $315-919 \times 10^6$ ) for the first infusion and  $943 \times 10^6$  (range:  $471-1481 \times 10^6$ ) for the second infusion with 90% ( $\pm 7\%$ ) purity. Neutropenia grade II occurred in two patients and was related to chemotherapy. Of the five patients, four showed disease stabilization before the end of NKAE treatment, and two showed a 50% reduction in bone marrow infiltration and a long-term ( $>1$  y) response. The NKAE cells had a highly cytotoxic phenotype and high cytotoxicity *in vitro*. Infused NKAE cells were detected in bone marrow and peripheral blood after infusions. *Ex vivo* expansion of autologous NK cells is feasible, NKAE cells are clinically active and the multiple infusions are well tolerated in patients with relapsed or refractory myeloma.

### ARTICLE HISTORY

Received 15 September 2016  
Revised 12 October 2016  
Accepted 13 October 2016

### KEYWORDS

Activated and expanded NK cells; cell therapy; clinical trial; immunotherapy; multiple myeloma

### Introduction

Immune-based therapies represent a new weapon in the fight against cancer. Natural killer (NK) cells comprise approximately 15% of lymphocytes, and their main function is to destroy cells that are virally infected, damaged, or transformed.<sup>1,2</sup> Although NK function is relatively well preserved in multiple myeloma (MM), the disease is generally associated with intense immune dysregulation.

It has been suggested that enhanced NK cell cytotoxicity might be part of the mechanism of action of effective anti-myeloma drugs such as lenalidomide (LEN) and bortezomib (BOR).<sup>3-6</sup> We found that NK cells effectively kill clonogenic MM cells in methylcellulose cultures.<sup>7</sup> The clinical experience with NK cell infusions in MM is limited. Two studies showed modest results in the setting of autologous stem cell transplantation in MM patients with very bad prognosis; notably, the toxicity was very low.<sup>8,9</sup>

There are several approaches to the *in vitro* activation of NK cells, but none are optimal for meeting clinical requirements.<sup>10,11</sup> Co-culture with the genetically modified cell line K562-mb15-41BBL makes it possible to expand *ex vivo* large

numbers of activated NK cells from MM patients under treatment. This cell line specifically activates NK cells even when only a small number of NK cells are available.<sup>12-14</sup>



There are several questions regarding NK cell therapy that must be resolved in order for this therapy to be clinically useful. (i) Can NK cells be used out of the transplantation setting? (ii) Can NK cells be used in combination with other anti-myeloma drugs? (iii) Can NK cells be infused and expanded several times? (iv) Are NK cells effective in this clinical setting? To answer these questions, we designed a phase I clinical trial that uses for the first time multiple infusions of autologous activated and expanded NK cells (NKAEs) in combination with the anti-myeloma drugs BOR or LEN in MM patients.

### Results

#### Clinical results

##### NKAE generation, activation, and expansion

Eighteen clinical GMP-grade products were generated for infusion. The five patients received a total of 36 NKAE infusions: 8 infusions in 4 patients, and 4 infusions in 1 patient (due to an

**CONTACT** Joaquín Martínez-López  [jmarti01@ucm.es](mailto:jmarti01@ucm.es)  Hematology Department, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid 28041, Spain.

 Supplemental data for this article can be accessed on the publisher's website.

\*These authors contributed equally to this work.

Published with license by Taylor & Francis Group, LLC © Alejandra Leivas, Antonio Perez-Martinez, María Jesús Blanchard, Estela Martín-Clavero, Lucía Fernández, Juan José Lahuerta, and Joaquín Martínez-López.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, and is not altered, transformed, or built upon in any way.

unrelated complication). We obtained a mean of  $20.82 \times 10^6$  (range:  $3.6\text{--}47 \times 10^6$ ) starting NK cells from 200 mL of peripheral blood (PB)/patient with no need for apheresis; this represented 17.4% (range: 6.5%–23.6%) of the total PBMCs. After the first week, the number of  $CD56^+CD3^-$  NKAEs increased 13-fold (mean of  $277.53 \times 10^6$  NKAEs; range:  $162.6\text{--}403.81 \times 10^6$ ). After the second week, NKAEs had increased 30-fold (mean of  $626.8 \times 10^6$  NKAEs; range:  $314.6\text{--}919.25 \times 10^6$ ). We collected  $550 \times 10^6$  ( $\pm 50 \times 10^6$ ) NKAEs from culture for the first infusion and left  $281 \times 10^6$  (range:  $153\text{--}439 \times 10^6$ ) growing in culture for the next infusion. At the time of harvest in the third week, the median number of NKAEs was  $942.6 \times 10^6$  (range:  $470.8\text{--}1480.8 \times 10^6$ ), and the cells were 91.7% ( $\pm 4.7\%$ ) pure (Fig. 1). At harvest, the cells had expanded 45-fold. The mean purity of the  $CD3^-CD56^+$  NKAEs the third week was 90% (range: 80.1%–99.2%). The purity was greater than 75% at all times, except for one patient who needed two expansion procedures for the second cycle of treatment because the first one did not meet our purity requirements. Overall, the median viability was 92.28% (range: 40.05%–99.05%).

#### T cell contamination

CD3 depletion was not necessary as we used autologous products, and the NKAe cells were produced using low concentrations of IL-2 to reduce potential T-cell proliferation (100 IU/mL). Even so, T cells represented 52% (range: 44.6%–66.3%) of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) after PB collection, but this percentage had decreased to 4% (range: 0.0%–11.6%) at the time the NKAe cells were harvested (Fig. 1).

#### Safety

C-Myc and telomerase (TERT) expression were not altered in the NKAe end products compared to the starting cell population. Two patients showed increases in cMyc and TERT expression during the second week of expansion, but the expression levels were back to baseline during the third week. Even so, no patient had any complications or secondary neoplasia. BCR-ABL expression was undetectable after the first week of culture and was undetectable in PB cells after NKAe therapy (Fig. S1). This indicates that the feeder cell line was eradicated from the cultures prior to infusion.

#### Efficacy and toxicity

Just prior to starting NKAe infusion therapy, patient 01 was being treated with LEN and showed asymptomatic progression (AP) with 70% bone marrow infiltration after 40 cycles. After NKAe infusion, the patient achieved a partial response (PR), the bone marrow infiltration had decreased to 30%, and M spike had decreased from 1.13 g/dL to 0.59 g/dL. PR was maintained for 13 mo with no other treatment after NKAe cell infusion than LEN + dexamethasone (Fig. 2 and Table 1), the same treatment used before NK infusion. There was no serious toxicity attributable to NKAe infusion, but this patient had grade II neutropenia that was related to the use of LEN before the clinical trial and did not require dose adjustment (Fig. S2).

Patient 02 was also being treated with 12 cycles of LEN and began receiving NKAe infusions while in relapse. She achieved stable disease that was maintained for 9 mo before disease

progression, and she did not need further treatment for 15 mo. Notably, bone marrow infiltration by MM cells decreased from 16% to 7% at the end of NKAe treatment in this patient (Fig. 2). Grade II neutropenia was observed, but like patient 01, patient 02 did not need dose adjustment.

Patient 03 achieved a very good PR (VGPR) after 14 cycles with BOR + bendamustine (BEN) treatment before enrolling in the clinical trial. This patient had no bone marrow infiltration and was monitored by serum lambda chain levels during follow-up. At follow-up, her serum lambda levels were lower than her initial levels during the first cycle of NKAe treatment (from 21.8 mg/mL to 10 mg/mL), but she had disease progression 2 mo after stopping treatment due to unrelated toxicity. There was no other toxicity related to NKAe therapy.

Patient 04 achieved PR with BOR+BEN (five cycles) before joining the clinical trial and showed 7% plasma cells in his bone marrow. He achieved disease stabilization 4 mo after the first NKAe infusion with no need for additional treatment (Table 1). After that, he received the same treatment he was receiving before NKAe cell infusions (BOR+BEN).

Patient 05 showed biological progression under LEN treatment (nine cycles) and 53% plasma cell infiltration into her bone marrow before NKAe cell treatment. Once she finished NKAe treatment, similar to patient 04, she showed disease stabilization 4 mo after the first NKAe infusion with no need for additional treatment (Table 1). This was maintained for 2 mo after the end of treatment. Afterward, she continued with the same treatment scheme with LEN she was receiving before NKAe infusions.

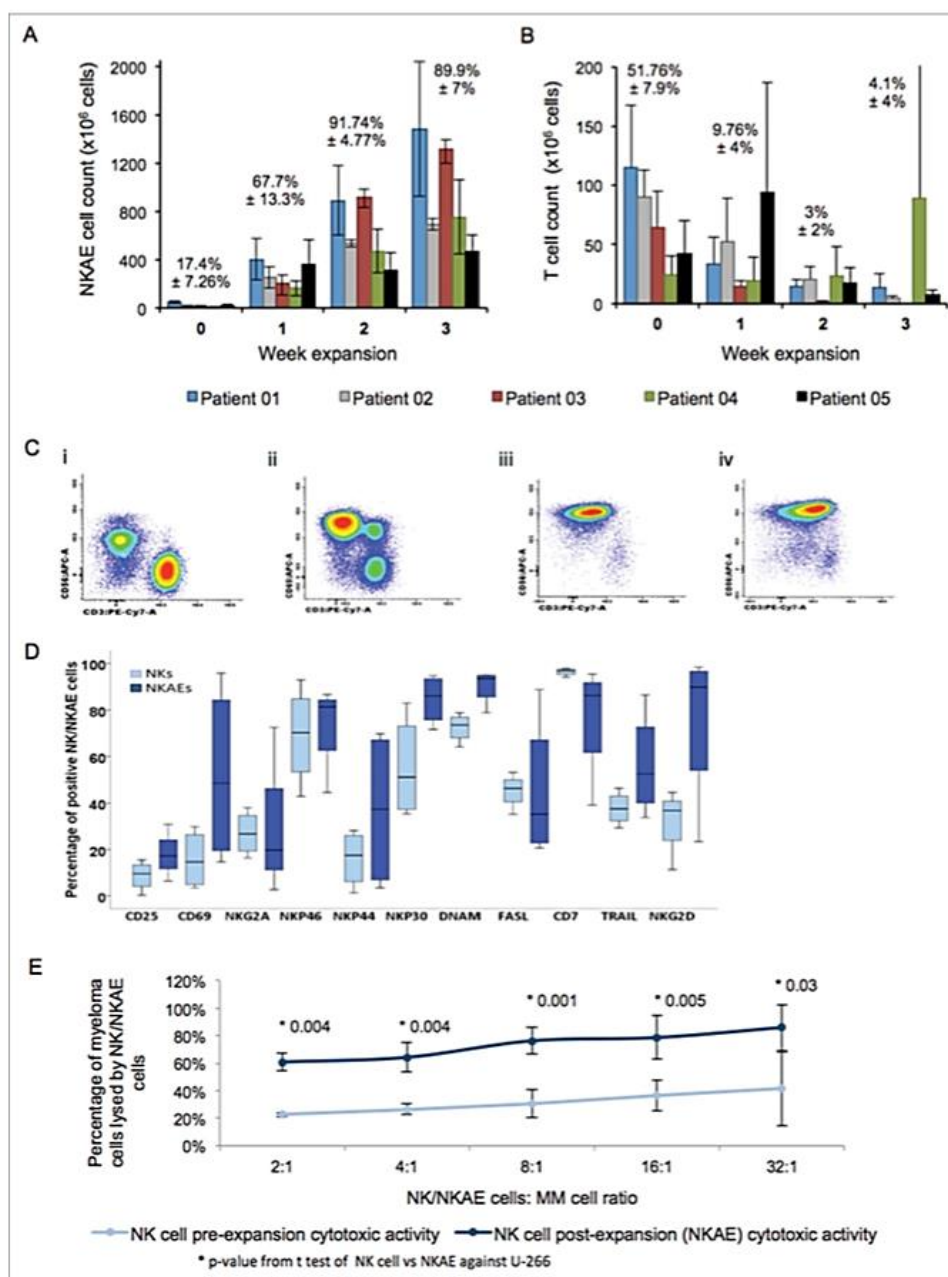
#### Effect of treatment on NKAes

Patients 03 and 04 were under treatment with BOR, and patients 01, 02, and 05 were under treatment with LEN. The patients did not show any differences in NK cell *ex vivo* expansion due to the anti-myeloma treatment they were receiving in that PBMCs obtained from patients under LEN treatment showed a proliferation capacity that was equal to that of PBMCs obtained from patients under BOR treatment. However, patients under BOR treatment showed better *in vivo* expansion. These patients had 15.15% NKs from PB (range: 8.8%–21.5%) before the first infusion, and this percentage increased to 26.9% (range: 24.9%–28.9%) before the next infusion. In contrast, patients treated with LEN showed only a 0.43% increase, from 24.86% (range: 17.22%–32%) to 25.29% (range: 23.5%–27.1%) (Fig. S3).

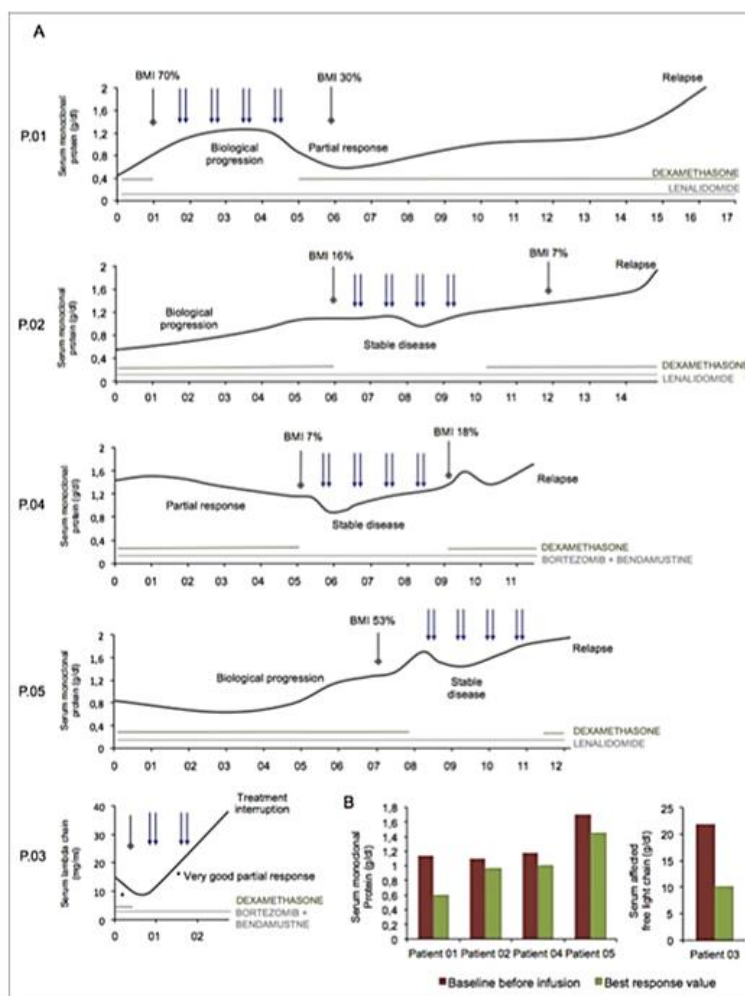
#### Biological studies

##### NKAe cell immunophenotype

After activation and expansion, the NKAe cells overexpressed activating receptors (Fig. 1) such as NKG2D ( $p = 0.07$ ), NKp44, NKp46, NKp30 DNAM-1, CD25 ( $p = 0.07$ ), and CD69 ( $p = 0.07$ ). TRAIL and FasL expression by NKAe cells also increased. Additionally, NKAe cells exhibited very high CD56 expression, whereas the expression level of CD16 (FcγRIIIa) was maintained. We evaluated the expression levels of the inhibitory protein NKG2A this tended to show higher expression levels in NKAe cells, but the increase was not significant ( $p = 0.317$ ).



**Figure 1.** Characteristics of the activated and expanded natural killer cells (NKAEs). The characteristics of NKAEs expanded from the multiple myeloma patients in the NCT02481934 clinical trial were monitored every week by flow cytometry, and cell counts were also performed weekly. The results are reported as the mean value  $\pm$  standard deviation of four independent expansion procedures from each patient. (A) The NKAe cell counts and (B) The reduction in T cell counts in the NKAe end products for the 18 expansion procedures. NKAe cell purity and T cell contamination percentages from each week are shown above its corresponding chart (as mean value  $\pm$  standard deviation). (C) Representative dot plots of flow cytometry analyses of NKAes during the expansion process. Each dot plot corresponds to each week of expansion (i: day 1, ii: day 7, iii: day 14, and iv: day 21). (D) NKAes overexpressed activating receptors and apoptosis ligands relative to NK cells before expansion. The data are reported as the median with interquartile range (IQR). (E) NKAes had significantly better cytotoxic activity than NK cells against U-266 myeloma cells. The data are reported as the mean value  $\pm$  standard deviation ( $n > 3$ ). The  $p$ -values are from  $t$ -tests comparing the percentage of U-266 cells lysed by the NK cells pre-expansion with those lysed by NKAes (NK cells post-expansion).



**Figure 2.** Assessment of the response of multiple myeloma patients to the infusion of activated and expanded natural killer cell (NKAEs). (A) The response to NKAe infusion was determined by monitoring the peripheral blood monoclonal protein levels (g/dL) until relapse and the bone marrow plasma cell infiltration (BMI) before and after NKAe cell therapy. The scale on the x-axis is months. Blue arrows indicate NKAe cell infusions, and gray arrows indicate when bone marrow aspirations were performed to determine BMI percentages. (B) The serum monoclonal protein levels and serum lambda chain levels (mg/mL) in patient 5 were compared before treatment and at the time of the best response.

### Cytotoxic activity of NKAe cells

The *in vitro* cytotoxic activity of freshly prepared NKAes against the U-266 MM cell line was always higher than the NK cell

activity before expansion. Compared with NK cells before expansion, the activity from NKAe cells was at least 2-fold higher at the same ratio ( $p < 0.03$ ) in a ratio range of 2:1 to 32:1 (Fig. 1).

**Table 1.** Summary of the results of the NCT02481934 clinical trial.

Situation before inclusion	Complete treatment	Response to NKAes	Response duration (months)	Time to next treatment (months)	Hematologic toxicity
Biological progression	YES	Partial response	13	15	GII
Biological progression	YES	Stable disease	9	12	GII
Very good partial response	NO (TWO CYCLES)	Not evaluable (NE)	NE	5	NO
Partial response	YES	Stable disease	7	10	NO
Biological progression	YES	Stable disease	6	NE	NO

\*Patient 3 withdraws the clinical trial before cycle 3 by an unrelated complication.

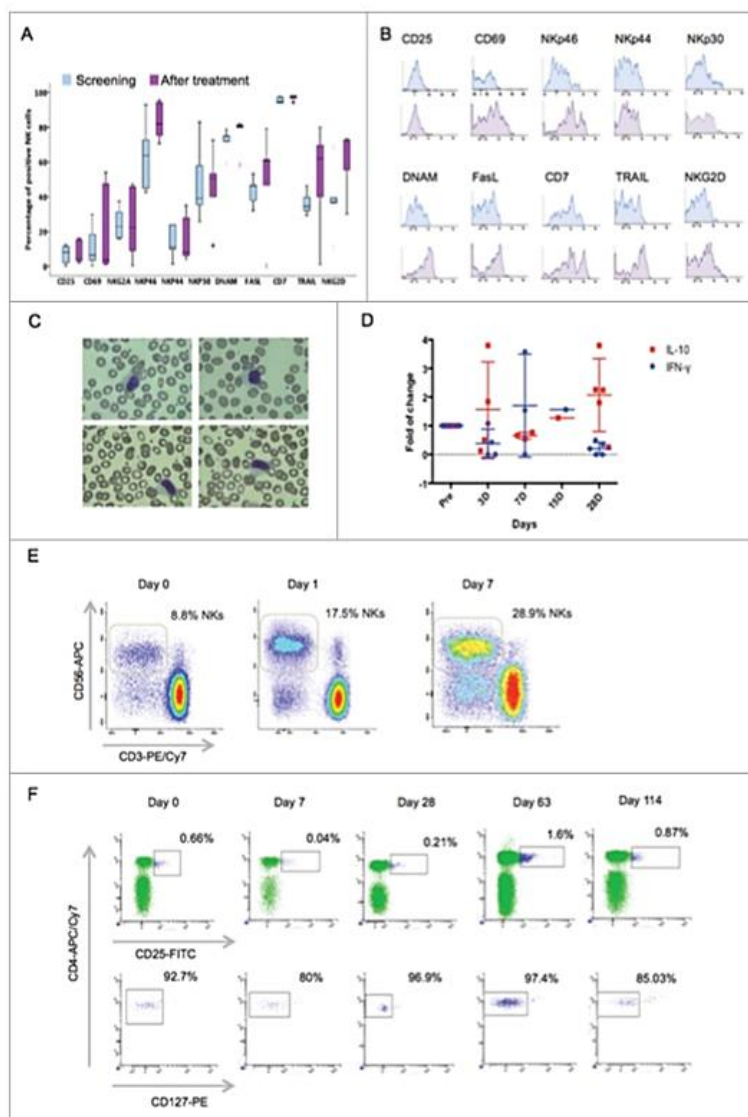


### NKAE and immune monitoring

NKAE cells were detected in PB. After NKAE cell treatment, activating receptors such as NKG2D and Nkp30 and the NK cell apoptosis receptors TRAIL and FasL were overexpressed in NK cells (Fig. 3). Moreover, NKAE cells were detected in the PB after each infusion. Examination of PB smears showed  $3.2 \pm 2$  activated circulating lymphocytes before infusion and a 2.6-fold increase of activated circulating lymphocytes

( $p < 0.05$ ) just after NKAE infusion ( $8.5 \pm 3$ ,  $p < 0.05$ ). This increase was maintained 1 h after the infusion ( $7.7 \pm 3.7$ ). One day after the infusion, we observed a 2.01-fold increase ( $6.7 \pm 3$ ) in activated circulating lymphocytes (Fig. 3).

NKAE cells were detected in patients 1 week after the first NKAE infusion, just before the second NKAE infusion (Fig. 3). The patients did not receive any cytokine infusions, such as IL-2 infusions, in order to avoid collateral effects. The median NK



**Figure 3.** Monitoring activated and expanded natural killer (NKAE). NKAE cells were detected in peripheral blood samples by flow cytometry. Peripheral blood was obtained from the patients each cycle before each infusion, then after infusion, and then 1 h, 1 d, and 3 d after infusion, as possible. (A) The expression of NK cell surface receptors before and after treatment with NKAE cells. The results are reported as the median with interquartile range for five independent procedures. (B) Representative histograms showing the expression of NK cell receptors from a single patient before and after NKAE cell treatment. (C) NK cells were detected on peripheral blood Wright stained smears. (D) Cytokine serum levels were analyzed before treatment and on days 1, 3, 7, 15, and 28 of NKAE cell treatment. The IL-10 and IFN $\gamma$  levels in five patients are shown as the fold changes compared to the screening (pre) cytokine concentrations. (E) Representative flow cytometry data of lymphocyte populations from a single patient during the first cycle. (F) The percentage of peripheral blood Treg CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> cells during treatment with NKAEs.



cell percentage in PBMCs at screening was 21.5% (range: 8.8%–32%), while 7 d after the first infusion (before the second infusion) the median NK cell percentage was 25.3% (range: 23.5%–27.1%).

In all cases, the patients had higher absolute NK cell counts 7 d after the first infusion. When they were screened before the first infusion, the patients had a median absolute NK cell count of 99.4 NK cells/ $\mu$ L (range: 61.6–384 NK cells/ $\mu$ L), while before the second infusion they had 188 NK cells/ $\mu$ L (range: 74.7–406.5 NK cells/ $\mu$ L). This shows that NKAE cells persist in PB with no need for extrinsic stimulus.

### Circulating cytokine levels

Circulating cytokines levels were analyzed in serum samples from the five patients. The patients showed increases in IFN $\gamma$  during the first 7 d after the infusion of NKAE cells, from 2.232 pg/mL (range: 0–3.25 pg/mL) to a maximum of 3.987 pg/mL (range: 2.34–8.82 pg/mL). Subsequently, the IFN $\gamma$  concentration decreased to levels lower than the basal serum concentration (0.599 pg/mL, range: 0–1.34 pg/mL) at the end of cycle (day 28), and this coincided with increases in IL-10 from 1.49 pg/mL (range: 0.69–8.1 pg/mL) to 2.424 pg/mL (range: 1.67–2.04 pg/mL) (Fig. 3). Further increases in the IFN $\gamma$  levels might be greater than described due to the sampling interval.

### Mechanisms of NK cell activity suppression

T cells and regulatory T cells (Treg cells) were not upregulated after NKAE cell infusion. We found that CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup> Treg lymphocytes were not overexpressed during the course of the NKAE infusions. In addition, the percentage of CD3<sup>+</sup> T cells was unchanged (Fig. 3).

### Discussion

Immunotherapy is increasingly important in cancer treatment. Some very interesting approaches based on immune therapies are emerging for the treatment of MM, including monoclonal antibodies that target immune checkpoints and CAR T cell infusion.<sup>15,16</sup>

This is the first study to combine NK cell therapy and anticancer drugs in a refractory MM patient population. One key finding was that it was feasible to perform several PB extractions from patients with MM, while they were receiving pharmacological treatment with no relevant adverse events. This is the first study to show that multiple infusions of NK cells can be performed without any relevant toxic effects.

Our data demonstrated that *ex vivo* expansion of autologous NK cells is feasible in patients with MM under treatment with the anti-myeloma agents LEN, BOR and even during the last phases of the disease. Our results showed that the anti-myeloma treatment of choice will not affect the success of the expansion procedure, so patients receiving immunomodulatory drugs as well as proteasome inhibitors, may be eligible for this kind of treatment. Multiple blood collections and cell expansions can be performed without difficulty. Blood collection is inexpensive relative to leukapheresis, which is also more complex.<sup>8</sup> Using PB collection, one can obtain enough cells for

several repeated expansions, and the infusion of moderate doses of NKAE cells is painless.

The design of this study allowed us to confirm that NKAE infusions have clear clinical efficacy in this population of patients with a bad prognosis and relapsed refractory MM. One patient who had relapsed after six lines of therapy achieved PR and subsequent disease stabilization. Another patient also achieved controlled MM after therapy with NKAE cells. This shows that two of the five patients had clinical benefits from the treatment; given the serious conditions of these patients, this is an excellent result.<sup>17</sup> We found that the combination of NKAEs plus LEN was the most clinically efficacious, since one patient achieved PR and the other achieved long-term disease stabilization; with BOR, one of two patients progressed. LEN and BOR are known to promote NK cell activity. In agreement with reports from other groups, our patients who were receiving BOR prior to and during NKAE cell treatment had better *in vivo* proliferation of NKAEs.<sup>18,19</sup>

The functionality of the NKAE cells was tested, and in all cases these cells showed high cytolytic activity against U-266 cells. In addition, the NKAE cells had a highly cytolytic phenotype, with high expression levels of activating receptors and apoptosis ligands. Notably, this correlated with their potent cytolytic activity *in vitro*.

The presence and increase in the number of NKAEs after infusion were described previously by Szmania et al.<sup>8</sup> Our study demonstrated that autologous NKAE cells could persist in PB between infusions without any noticeable toxicity. These data suggest that it is possible to perform regular NKAE infusions rather than just one infusion at the beginning of pharmacological treatment and that there is no need for cytokine infusions.

The autologous NKAEs were well tolerated. Although the patients did not receive dexamethasone during their treatment, we observed no relevant mechanisms of regulation of NKAE cells activity. The presence of Treg cells was considered important, as these cells are responsible for NK and T cell suppression.<sup>20,21</sup> The absence of IL-2 administration might favor the lack of mechanisms of regulation, since IL-2 administration increases the number of suppressive Treg cells in cancer patients.<sup>22</sup> The Treg cell level was unchanged during the course of this study.

Only the increase in IL-10 at the end of the cycle, which corresponded to a reduction in IFN $\gamma$  levels, was notable. Interestingly, the IL-10 levels were always inversely related to the IFN $\gamma$  levels. It is known that IL-10 is associated with regulation mechanisms,<sup>23,24</sup> but its role in myeloma pathogenesis still unknown, and its increase could be a way to compensate for the increase in IFN $\gamma$ . Patients enrolled in this clinical trial did not exhibit any symptoms related to the upregulation of mechanisms of suppression, and IL-10 levels had no direct impact on patient prognosis.

In summary, we found that the activation and expansion of NK cells using the K562-mb15-41BBL cell line allowed multiple infusions of NK cells in MM patients. NKAEs plus LEN showed clinical efficacy in MM. Further clinical trials are warranted to assess the efficacy of NKAE in different settings.

### Methods

#### Study design and eligibility

This single-arm open-label phase I trial (NCT02481934) tested the tolerability of the combination of multiple infusions of

NKAES plus LEN or BOR in patients with relapsed refractory myeloma. Patients with MM with more than two relapses were eligible. Patients had to show a partial or stable response or AP to their most recent treatment, which was the treatment of choice in the clinical trial. The presence of measurable disease was defined as serum M protein 0.1 g/dL; urine M spike 200 mg/dL; or abnormal free light chain ratio, a measurable plasmacytoma, or >10% plasma cells in the bone marrow aspirate. Additional eligibility criteria are shown in Table S1.

All patients provided written informed consent as per the Declaration of Helsinki, and the study was approved by the Hospital Universitario 12 de Octubre Institutional Review Board. The study was conducted using funding from a Spanish Health program for clinical trials without support from the pharmaceutical industry. Common terminology criteria for adverse events version 3.0 were used to define and grade adverse events.

### Objectives of the study

The main objective of this trial was to assess the toxicity and feasibility of NKAES in combination with the anti-myeloma drugs LEN or BOR. A secondary objective was to evaluate the efficacy of NKAES therapy. Eligible patients had to maintain the same rescue treatment (LEN or BOR) that had elicited their earlier response. This way, any change in the patient's status during the clinical trial would be attributable to NKAES cell infusion or to MM.

### Cell lines

K562-mb15-41BBL GMP grade cells were kindly provided by Dario Campana,<sup>14,25</sup> former researcher from St. Jude Children's Research Hospital (Memphis, TN) and U-266 myeloma cells were purchased from DSMZ (Catalog number ACC-9) that performs cell line characterizations by short tandem repeat DNA typing and were used within 6 mo after resuscitation. In addition, cells were tested for mycoplasma contamination. Cells were incubated in RPMI medium (Biowest, catalog number L0498-500) with 10% FCS (Hyclone, catalog number SV30160) in a humidified 5% CO<sub>2</sub> chamber at 37°C.

### Patients

Five eligible patients with relapsed refractory MM (2–7 prior lines of therapy) were included in this study. The patient characteristics are shown in Table 2. Notably, three patients showed AP during the last treatment line just prior to the inclusion in the clinical trial and two showed PR after progression treatment. Three were treated with LEN-based regimens and two with BOR-based regimens.

### Treatment and monitoring schema

After screening and registration, patients underwent four blood extractions of 200 mL of PB every 28 d to activate and expand the NK cells. The blood was collected in conventional bags for blood donation with 15 IU/mL of sodium heparin. Each of the four blood extractions was performed before each of the four scheduled treatment cycles (Fig. 4). PBMCs cells were isolated by centrifugation over a density gradient (Ficoll-Paque PLUS; GE Healthcare, catalog number 17-1440-02). The PBMCs were then activated and expanded for 3 weeks to achieve NKAES expansion. PBMCs were co-culture with the K562-mb15-41BBL feeder cell line plus 100 IU/mL of IL-2 under good manufacturing practice (GMP) conditions as described previously.<sup>12–14, 25</sup> NKAES cells were harvested on day 14 and 21 for infusions. Four cycles of pharmacological treatment and two infusions of  $7.5 \times 10^6$  autologous NKAES/kg were performed on days 1 and 8 of each cycle (Fig. 4).

Patients were treated with 4-week cycles of LEN or BOR, whichever they had received previously with no pause prior study inclusion and during the clinical trial; corticoids (dexamethasone) were withdrawn 15 d before starting the NK cell expansion. After finishing the NKAES infusions, the same previous treatment (LEN or BOR) with dexamethasone was performed until relapse.

### Evaluation the safety of NKAES cell infusion

The safety and the lack of oncogenic effects of the NKAES and products were verified using real-time PCR to detect c-MYC and TERT expression in NKAES cells cDNA in the second and third weeks of expansion. Primers and probes were from Applied Biosystems (Life Technologies). Additionally, BCR-

Table 2. The characteristics of the five multiple myeloma patients prior to the infusion of activated and expanded natural killer cells (NKAES).

Patient	Age	Sex	Cytogenetics by FISH in CD138 <sup>+</sup> cells	Relapses (n) before the clinical trial	Previous ASCT	Previously treated with lenalidomide and bortezomib	Time from diagnosis of SMM and NKAES treatment (years)	Concomitant treatment with NKAES	Situation before inclusion
1	53	M	1q amplification	5	2	Y	7	Len	Biological Progression
2	61	F	14q deletion	2	1	Y	2	Len	Biological Progression
3	73	F	1q amplification 17p deletion	4	0	Y	5	Bor+Ben	Very Good Partial Response
4	62	M	1q amplification 17p deletion	6	2	Y	10	Bor+Ben	Partial Response
5	72	F	1q amplification 17p deletion	7	2	Y	13	Len	Biological Progression

Notes: SMM: symptomatic multiple myeloma, ASCT: autologous haematopoietic stem cell transplantation.

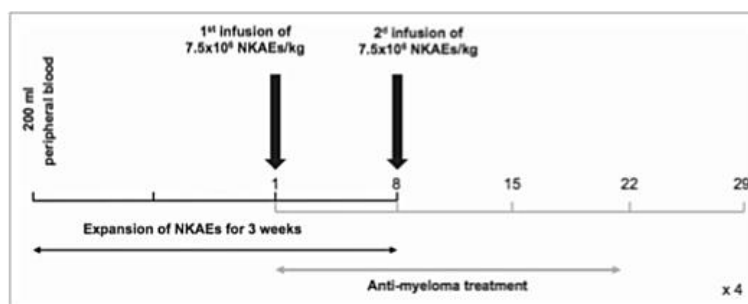


Figure 4. Treatment procedures and timeline. Two weeks before each cycle of chemotherapy, 200 mL of peripheral blood was extracted from each of the five multiple myeloma patients to produce activated and expanded natural killer cells (NKAES). The NKAES were infused in the second and third weeks of expansion on days 1 and 8 of each of the four cycles of lenalidomide- or bortezomib-based treatment. The scale in the x-axis is days.

ABL qPCR studies were carried out using cDNA from NKAES cultures and from patient PB samples after treatment to verify the absence of K562-mb15-41BBL cells in NKAES end products with primers and probes from Tip Molbiol (Eresburgstrasse). Real-time PCR studies were performed as described previously using an ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System (Life Technologies).<sup>26</sup>

#### Immune monitoring and MM response assessment

Immune monitoring was carried out using PB samples. Blood samples for immune monitoring were obtained before treatment and on days 1, 3, 7, 14, and 28 of the first cycle; on days 1, 7, and 28 of the subsequent cycles; and 30 d after completion of the entire therapeutic regimen. The tumor response was evaluated every 4 weeks and 30 d after all protocol therapy was completed, including bone marrow assessment.

#### NK and T cell monitoring

##### Flow cytometry analysis of NK cells

The number and presence of NK and NKAES cells ( $CD3^+CD56^+$ ) were analyzed by flow cytometry on a FACS-Canto II™ cytometer (BD Biosciences) based on the percentage of the NK cell population and on the expression of the activating receptors NKG2D and NKp30. The gating strategy was based on dead/live cells and doublet discrimination. The antigen expression profiles of NK and NKAES cells were evaluated using the following fluorescently-conjugated antibodies: CD69, CD25, CD31, DNAM-1, FasL, CD7, TRAIL, NKG2D, NKp46, NKp30, NKp44, and NKG2A (Table S2 lists all of the antibodies used in this study). The data were analyzed with FACSDiva™ software (BD Biosciences).

##### Peripheral blood smears

Wright stained smears of peripheral blood from patients were also performed before infusion, immediately after infusion, 1 h after infusion and 1 d after infusion. Images were acquired on a Nikon 80i light microscope supplied with a Nikon DS-Fi1 camera and a PLAN 100 XA/ NA 1.25 Oil objective (Nikon).

#### Flow cytometry analysis of Treg $CD4^+CD25^+CD127^-$

The regulatory  $CD4^+CD25^+CD127^-$  T-lymphocyte responses of three patients were analyzed by flow cytometry of fresh PB samples based on the percentage of cells.

#### Eu-TDA release assay

The cytotoxicity of PBMC and NKAES cells was assessed using Eu-TDA release assays following the manufacturer's instructions. U-266 myeloma cells were used as target cells and were incubated for 2 h with effector cells (NKAES) at the indicated effector: target (E:T) ratio. The specific lysis percentage was calculated as described previously.<sup>13</sup>

#### Cytokine expression profile analysis

The cytokine expression profile was analyzed by flow cytometry using the BD™ Cytometric Bead Array from BD Biosciences following the manufacturer's protocol. IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN $\gamma$ , and IL-17A were monitored in serum samples from the five patients on days 0, 3, 7, and 30 after infusion.

#### Statistical analysis

Assay data were compared using the Student's *t*-test or the Wilcoxon test. Significance was defined as  $p < 0.05$ .

#### Disclosure of potential conflicts of interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

#### Acknowledgments

We wish to thank the participating patients and their families. We thank all the study co-investigators, and Dr. Dario Campana (National University of Singapore) and St. Jude Children's Research Hospital (Memphis, TN) for providing the K562-mb15-41BBL cells.

#### Funding

This clinical trial was funded by the CRIS Foundation to Beat Cancer (2014/0120) and by the Spanish Ministry of Health (EC11-036).

# Author contributions

A.L., J.M.L., J.J.L., and A.P.M. contributed to the study conception and design. A.L., J.M.L., and J.J.L. were responsible for the protocol development. J.M.L., J.J.L., and M.J.B. contributed to the patient recruitment. A.L. and E.M.C. performed experiments. A.L., J.M.L., E.M.C., and L.F. contributed to the acquisition of data. A.L., L.F., A.P., and J.M.L. contributed to the data analysis and interpretation. All authors were responsible for the preparation and review of the final version of the manuscript.

A medical writer contracted by the sponsor provided assistance in preparing the manuscript. The funder of the study had no role in the writing of the report.

# References

- Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001; 22:633-40; PMID:11698225; [http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4906\(01\)02060-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4906(01)02060-9)
- Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:850-61; PMID:12415255; <http://dx.doi.org/10.1038/nrc928>
- Shi J, Tricot GJ, Garg TK, Malaviarachchi PA, Szmania SM, Kellum RE, Storrie B, Mulder A, Shaughnessy JD, Jr., Barlogie B et al. Bortezomib down-regulates the cell-surface expression of HLA class I and enhances natural killer cell-mediated lysis of myeloma. *Blood* 2008; 111:1309-17; PMID:17947507; <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2007-03-078535>
- Wu L, Adams M, Carter T, Chen R, Muller G, Stirling D, Schafer P, Bartlett JB. lenalidomide enhances natural killer cell and monocyte-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity of rituximab-treated CD20+ tumor cells. *Clin Cancer Res* 2008; 14:4650-7; PMID:18628480; <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4405>
- Wu L, Parton A, Lu L, Adams M, Schafer P, Bartlett JB. Lenalidomide enhances antibody-dependent cellular cytotoxicity of solid tumor cells in vitro: influence of host immune and tumor markers. *Cancer Immunol Immunother* 2011; 60:61-73; PMID:20848094; <http://dx.doi.org/10.1007/s00262-010-0919-9>
- Zhu D, Corral LG, Fleming YW, Stein B. Immunomodulatory drugs Revlimid (lenalidomide) and CC-4047 induce apoptosis of both hematological and solid tumor cells through NK cell activation. *Cancer Immunol Immunother* 2008; 57:1849-59; PMID:18392823; <http://dx.doi.org/10.1007/s00262-008-0512-7>
- Swift BE, Williams BA, Kosaka Y, Wang XH, Medin JA, Viswanathan S, Martinez-Lopez J, Keating A. Natural killer cell lines preferentially kill clonogenic multiple myeloma cells and decrease myeloma engraftment in a bioluminescent xenograft mouse model. *Haematologica* 2012; 97:1020-8; PMID:22271890; <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2011.054254>
- Szmania S, Lapteva N, Garg T, Greenway A, Lingo J, Nair B, Stone K, Woods E, Khan J, Stivers J et al. Ex vivo-expanded natural killer cells demonstrate robust proliferation in vivo in high-risk relapsed multiple myeloma patients. *J Immunother* 2015; 38:24-36; PMID:25415285; <http://dx.doi.org/10.1097/CJI.0000000000000059>
- Shi J, Tricot G, Szmania S, Rosen N, Garg TK, Malaviarachchi PA, Moreno A, Dupont B, Hsu KC, Baxter-Lowe LA et al. Infusion of haplo-identical killer immunoglobulin-like receptor ligand mismatched NK cells for relapsed myeloma in the setting of autologous stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2008; 143:641-53; PMID:18950462; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07340.x>
- Perez-Martinez A, Fernandez L, Valentin J, Martinez-Romera I, Corral MD, Ramirez M, Abad L, Santamaria S, Gonzalez-Vicent M, Sirvent S, et al. A phase I/II trial of interleukin-15-stimulated natural killer cell infusion after haplo-identical stem cell transplantation for pediatric refractory solid tumors. *Cytotherapy* 2015; 17:1594-603; PMID:26341478; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.07.011>
- McDowell KA, Hank JA, DeSantes KB, Capitini CM, Otto M, Sondel PM. NK cell-based immunotherapies in Pediatric Oncology. *J Pediatr Hematol Oncol* 2015; 37:79-93; PMID:25590232; <http://dx.doi.org/10.1097/MPH.0000000000000303>
- Shimasaki N, Coustan-Smith E, Kamiya T, Campana D. Expanded and armed natural killer cells for multiple myeloma immunotherapy. *Cytotherapy* 2016; (11):1422-1434; PMID:27497701; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.06.013>
- Garg TK, Szmania SM, Khan JA, Hoering A, Malbrough PA, Moreno-Bost A, Greenway AD, Lingo JD, Li X, Yaccoby S et al. Highly activated and expanded natural killer cells for multiple myeloma immunotherapy. *Haematologica* 2012; 97:1348-56; PMID:22419581; <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2011.056747>
- Fujisaki H, Kakuda H, Shimasaki N, Imai C, Ma J, Lockey T, Eldridge P, Leung WH, Campana D. Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy. *Cancer Res* 2009; 69:4010-7; PMID:19383914; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3712>
- Garfall AL, Stadtmauer EA, June CH. Chimeric antigen receptor T cells in myeloma. *N Engl J Med* 2016; 374:194; PMID:26760100; <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMc1507847>
- Atanackovic D, Radhakrishnan SV, Bhardwaj N, Luetkens T. Chimeric Antigen Receptor (CAR) therapy for multiple myeloma. *Br J Haematol* 2016; 172:685-98; PMID:26791002; <http://dx.doi.org/10.1111/bjh.13889>
- Dimopoulos MA, Chen C, Spencer A, Niesvizky R, Attal M, Stadtmauer EA, Petrucci MT, Yu Z, Olesnyckij M, Zeldis JB et al. Long-term follow-up on overall survival from the MM-009 and MM-010 phase III trials of lenalidomide plus dexamethasone in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *Leukemia* 2009; 23:2147-52; PMID:19626046; <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2009.147>
- Lundqvist A, Berg M, Smith A, Childs RW. Bortezomib treatment to potentiate the anti-tumor immunity of Ex-vivo expanded adoptively infused autologous natural killer cells. *J Cancer* 2011; 2:383-5; PMID:21750690; <http://dx.doi.org/10.7150/jca.2.383>
- Lundqvist A, Yokoyama H, Smith A, Berg M, Childs R. Bortezomib treatment and regulatory T-cell depletion enhance the antitumor effects of adoptively infused NK cells. *Blood* 2009; 113:6120-7; PMID:19202127; <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-11-190421>
- Gasteiger G, Fan X, Dikiy S, Lee SY, Rudensky AY. Tissue residency of innate lymphoid cells in lymphoid and nonlymphoid organs. *Science* 2015; 350:981-5; PMID:26472762; <http://dx.doi.org/10.1126/science.aac9593>
- Trzonkowski P, Szmít E, Mysliwska J, Dobyszek A, Mysliwski A. CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8+ and NK lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction. *Clin Immunol* 2004; 112:258-67; PMID:15308119; <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2004.04.003>
- Ahmadzadeh M, Rosenberg SA. IL-2 administration increases CD4+CD25(hi) Foxp3+ regulatory T cells in cancer patients. *Blood* 2006; 107:2409-14; PMID:16304057; <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2005-06-2399>
- Andre T, Najjar M, Stamatopoulos B, Pieters K, Pradier O, Bron D, Meuleman N, Lagneaux L. Immune impairments in multiple myeloma bone marrow mesenchymal stromal cells. *Cancer Immunol Immunother* 2015; 64:213-24; PMID:25341809; <http://dx.doi.org/10.1007/s00262-014-1623-y>
- Alexandrakis MG, Goulidaki N, Pappa CA, Boula A, Psarakis F, Neokakis I, Tsirakis G. Interleukin-10 induces both plasma cell proliferation and angiogenesis in multiple myeloma. *Pathol Oncol Res* 2015; 21:929-34; PMID:25743259; <http://dx.doi.org/10.1007/s12253-015-9921-z>
- Imai C, Iwamoto S, Campana D. Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells. *Blood* 2005; 106:376-83; PMID:15755898; <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2004-12-4797>
- Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisaard N, Barbany G, Cazzaniga G, Cayuela JM, Cave H, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia* 2003; 17:2318-57; PMID:14562125; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.leu.2403135>



**Novel treatment strategy with autologous activated and expanded natural killer cells plus anti-myeloma drugs for multiple myeloma**

**Leivas et al.**

**NK cells therapy for multiple myeloma**

## Supplementary tables

Inclusion Criteria	Value
Age	> 18 years
Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG)	≤ 2
Absolute Neutrophil Count	> 1000/ $\mu$ l
Platelets	> 50000/ $\mu$ l
Hemoglobin	> 8.0 g/dl
Serum creatinine	< 2.0 mg/dl
Serum transaminases	< 2.5 times upper normal limit
Bilirubin	< 1.5 times upper normal limit
Signed informed consent	
Exclusion criteria	
No response to relapse treatment	
Patients who achieved complete response	
Uncontrolled infection	
Another active malignancy	
Immediate need of chemotherapy	
Active B/C hepatitis	
Prior history of HIV infection	
Pregnant or nursing women	

Table S1. List of other eligibility criteria for patient inclusion in the clinical trial.

Antigen	Clone	Fluorochrome	Source	Catalog number
CD3	UCHT1	PE/Cy7	Biolegend	351304
CD4	RPA-T4	APC/Cy7	Biolegend	300518
CD7	CD7-6B7	FITC	Biolegend	343104
CD16	3G8	APC/Cy7	BD Pharmingen	557758
CD19	SJ25C1	PE	Biolegend	363004
CD25	BC96	FITC	Biolegend	302604
CD31	WM59	FITC	Biolegend	301104
CD45	HI30	FITC	Biolegend	304006
CD56 (NCAM)	HCD56	APC	Biolegend	318310
CD127 (IL-7R $\alpha$ )	A019D5	PE	Biolegend	351304
CD69	FN50	PE	Biolegend	310906
CD178 (FasL)	NOK-1	PE	Biolegend	306407
CD253 (TRAIL)	RIK-2	PE	Biolegend	308206
DNAM-1 (CD226)	TX25	FITC	Biolegend	337104
NKG2A (CD159a)	#131411	PE	R&D Systems	FAB1059P
NKG2D (CD314)	1D11	PE	Biolegend	320806
NKp30	AF29-4D12	PE	Miltenyi	130-092-483
NKp44	Z231	PE	IOtest	PNIM3710
NKp46	9E2	PE	Biolegend	331908
PROPIDIUM IODURE			Sigma Aldrich	P4864

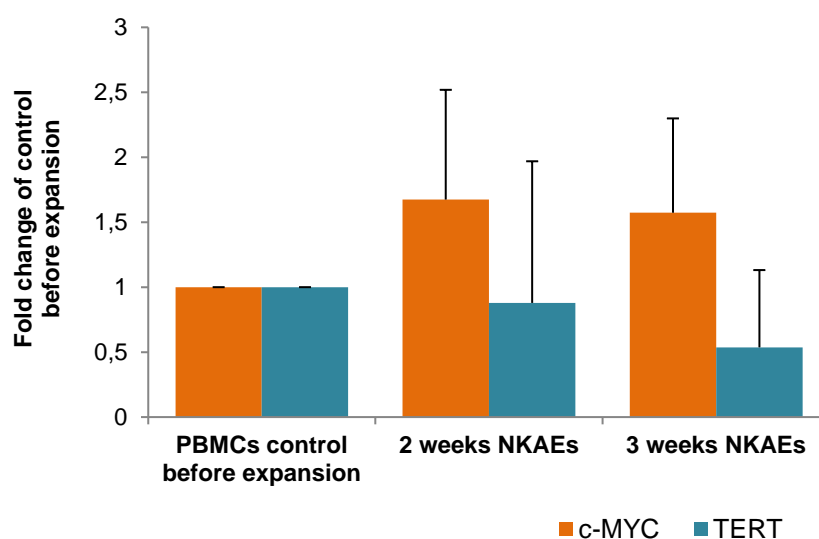
**Supplementary content 2.** List of antibodies used for flow cytometry experiments. FITC, fluorescein isothiocyanate; PE, phycoerythrin; PE/Cy7 tandem constituted by phycoerythrin and cyanin 7; APC, allophycocyanin; APC/Cy7 tandem constituted by allophycocyanin and cyanin 7.

Table S2. List of antibodies used for flow cytometry experiments.



## Supplementary figures

A



B

	Percentage of BCR-ABL expression (mean± Standard deviation)
Patient PB before treatment	Undetectable
NKAEs day 14	1.36% ± 1.47
NKAEs day 21	0.64% ± 1.2
Patient PB after treatment	Undetectable

Figure S1. **Assessment of the safety of infusion of activated and expanded natural killer cells (NKAEs).** NKAE infusion was safe and non-oncogenic. The results are reported as the mean ± standard deviation of determinations in the five patients. A) The expression of c-Myc and telomerase in NKAEs was evaluated weekly during the expansion process and in the NKAE end products before infusion. B) The expression of BCR-ABL was evaluated on NKAEs during the expansion process and in peripheral blood after NKAE infusion.

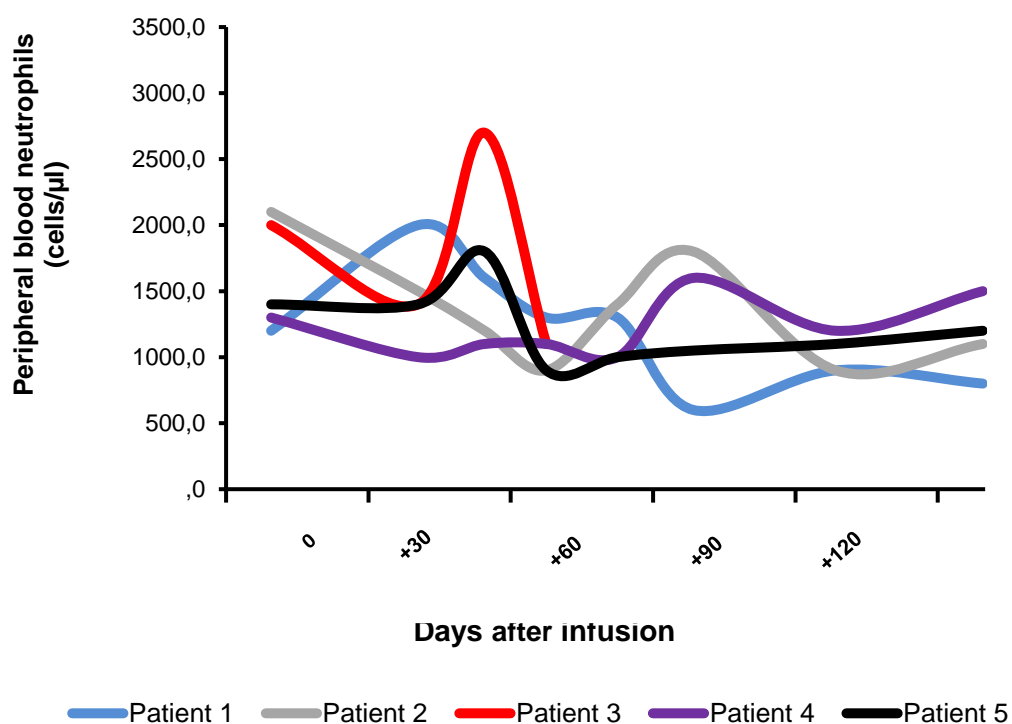
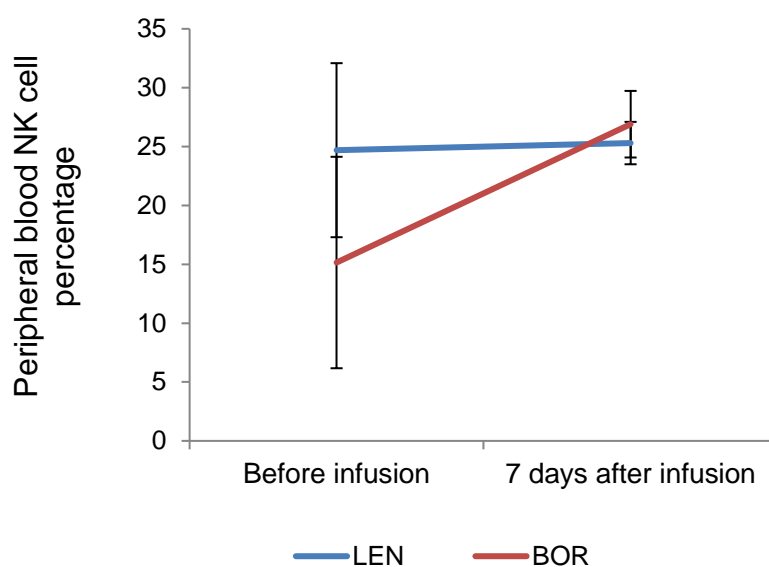
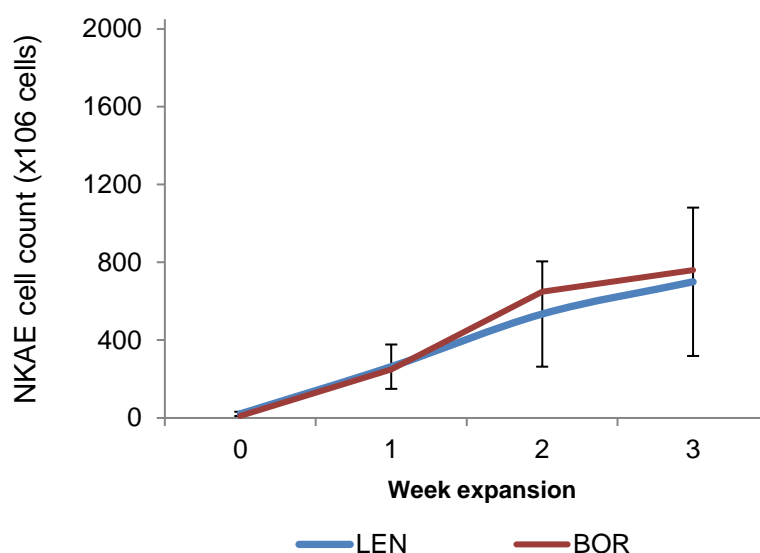


Figure S2. Hematological toxicity in multiple myeloma patients during the infusion of activated and expanded natural killer cells.

A



B



**Figure S3. Effects of pharmacological treatment on activated and expanded natural killer cells (NKAEs).** Patients receiving NKAe infusions were under treatment with lenalidomide or bortezomib. A) In vivo expansion of NKAEs from patients under treatment with LEN (patients 01, 02, and 05) and from patients under treatment with BOR (patients 03 and 04). B) Cell counts of NKAEs from patients under treatment with bortezomib (patients 03 and 04), which were expanded 8 times, and cell counts of NKAEs from patients under treatment with

lenalidomide (patients 01, 02, and 05), which were expanded 12 times. The results are reported as the mean  $\pm$  standard deviation.



// Anexo 2



	<b>PROTOCOLO DE ENSAYO CLINICO</b>	<b>Fecha</b>	<b>Versión</b>	<b>Pág.</b>
		19-12-12	3	1/66
		<b>Código:</b>	NK-VS-MM	

**Ensayo clínico Fase I para evaluar la seguridad y dosis de la infusión de células NK autólogas expandidas y activadas en la consolidación del tratamiento de los enfermos con mieloma múltiple en segunda o más recaída**

**PROMOTOR:** Dr Joaquín Martínez López  
Hospital U. 12 de Octubre  
Avda. de Córdoba, s/n  
28041 Madrid  
Tel. +34 917792787

\_\_\_\_\_  
(Fecha y firma)

**RESPONSABLE DE MONITORIZACIÓN:** APICES  
c/ Salamanca, 7  
28991 Madrid  
Tel. +34 91 816 68 04  
Fax. +34 91 816 91 72

\_\_\_\_\_  
(Fecha y firma)

**INVESTIGADOR PRINCIPAL:** Dr. Joaquín Martínez López  
Hospital U. 12 de Octubre  
Avda. de Córdoba, s/n  
28041 Madrid  
Tel. +34 917792787

\_\_\_\_\_  
(Fecha y firma)



	<b>PROTOCOLO DE ENSAYO CLINICO</b>	<b>Fecha</b>	<b>Versión</b>	<b>Pág.</b>
		19-12-12	3	2/66
		<b>Código:</b>	NK-VS-MM	

**1. RESUMEN**

<b>Tipo de solicitud</b>	Ensayo terapéutico exploratorio, abierto, no randomizado, Fase I, para evaluar la seguridad y dosis de la infusión de células NK autólogas expandidas y activadas en la consolidación del tratamiento de los enfermos con mieloma múltiple en segunda o más recaída
<b>Título del estudio</b>	Ensayo clínico Fase I para evaluar la seguridad y dosis de la infusión de células NK autólogas expandidas y activadas en la consolidación del tratamiento de los enfermos con mieloma múltiple en segunda o más recaída
<b>Código:</b>	NK-VS-MM
<b>Promotor</b>	Dr. Joaquín Martínez López Hospital U. 12 de Octubre Avda. de Córdoba, s/n 28041 Madrid Tel. +34 917792787
<b>Responsable de monitorización</b>	APICES c/ Salamanca, 7 28991 Madrid Tel. +34 91 816 68 04 Fax. +34 91 816 91 72
<b>Investigador Principal y colaborador</b>	Dr. Joaquín Martínez López, Dr. Juan José Lahuerta Palacios, Dra. Lizheidy Sarmiento Serrano Hospital U. 12 de Octubre Avda. de Córdoba, s/n 28041 Madrid Tel: (+34) 917792787
<b>Centros</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hospital Universitario 12 de Octubre. Servicio de Hematología, Unidad de investigación traslacional. Se realizará la selección de enfermos, tratamiento experimental y seguimiento. Además de los estudios biológicos asociados. Servicio colaborador: Servicio de Medicina Nuclear</li> <li>- Hospital Niño Jesús, Servicio de Onco-Hematología pediátrica, laboratorio de terapia celular. En el se realizará la preparación, procesamiento y criopreservación de las células NKAes en bajo condiciones de buena práctica de manufacturación y su seguridad. Este laboratorio esta acreditado y autorizado por la ANEMPs para la preparación de productos celulares como agente terapéutico</li> </ul>
<b>CEIC de</b>	Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario 12 de Octubre

	<b>PROTOCOLO DE ENSAYO CLINICO</b>	<b>Fecha</b>	<b>Versión</b>	<b>Pág.</b>
		19-12-12	3	3/66
		<b>Código:</b>	NK-VS-MM	

**referencia**

**Fase del estudio clínico** Ensayo clínico abierto, no randomizado Fase I

**Objetivos**

Objetivo primario:

- 1.- Determinar la seguridad de la infusión de células autólogas NK expandidas junto a drogas antimieloma en pacientes con MM.
- 2.- Establecer la dosis y esquema de infusión adecuado de células NK autólogas activadas junto a fármacos antimieloma.

Objetivo secundario:

- 1.- Determinar la eficacia de la infusión de células NK en términos de incremento de la respuesta según reducción de componente monoclonal o mejora de la calidad de la respuesta según los criterios IMF/EBMT.
- 2.- Determinar los mecanismos moleculares y celulares de acción antimieloma de las células NK autólogas.
- 3.- Establecer un protocolo con reproducibilidad y viabilidad clínicas.

**Diseño** Ensayo terapéutico exploratorio, abierto, no randomizado, Fase I

**Patología en estudio** Mieloma múltiple en recaída

**Población en estudio:**

**Tamaño de la muestra:**

Se pretenden incluir entre 10-15 casos en 18 meses

**Criterios de inclusión/exclusión**

- Edad entre 20 y 80 años
- Con mieloma múltiple en 2<sup>da</sup> o sucesivas recaídas o resistentes a dos líneas de tratamiento
- ECOG menor o igual a 2
- Expectativa de vida mayor a seis meses
- Aclaramiento de creatinina mayor de 30 ml/min.
- Haber recibido un tratamiento de rescate según el procedimiento del centro de un mínimo de 4 ciclos, este será variable en función de los tratamientos recibidos previamente. Tras este tratamiento los enfermos deberán haber demostrado quimiosensibilidad y haber obtenido al menos estabilización de la enfermedad.
- Se incluirán pacientes que hayan obtenido enfermedad estable o respuesta parcial estable (de al menos 2 ciclos de estabilidad) después de cumplido el 75% del tratamiento de rescate proyectado o que se encuentren en situación de

	<b>PROTOCOLO DE ENSAYO CLINICO</b>	<b>Fecha</b>	<b>Versión</b>	<b>Pág.</b>
		19-12-12	3	4/66
		<b>Código:</b>	NK-VS-MM	

progresión subclínica (definida por un incremento del componente monoclonal  $\geq 25\%$ ) en cualquier momento del tratamiento de rescate. La tolerancia al tratamiento de rescate habrá debido ser aceptable, sin efectos adversos G3/4, y de existir efectos adversos G1/2, estos deberán ser objetivados inmediatamente antes del inicio del programa de reinfusión.

- Estar de acuerdo en participar en el ensayo y firmar el consentimiento informado.
- No se incluirán pacientes en progresión clínica o que muestren remisión completa

#### Tratamientos

Se mantendrá el esquema de tratamiento elegido para el tratamiento de la recidiva o la progresión, habitualmente Bortezomib o Lenalidomida, pero también serán incluibles pacientes con otros tratamientos de rescate alternativos, p.ej.: Bendamustine o combinaciones de Bortezomib y Lenalidomida o tratamientos basados en esquemas de quimioterapia convencional. Estos tratamientos suelen venir combinados con fármacos corticosteroides que serán suspendidos debido a que estos afectan la funcionalidad de las células NK. Un período de lavado de 2 semanas será necesario. Se administrarán 4 ciclos del tratamiento escogido para cada paciente, además de 2 infusiones de NKAES por ciclo en la primera cohorte de pacientes. La dosis de células NKAES será siempre la misma,  $7.5 \times 10^6$ , existiendo sólo la escalada de la frecuencia de las infusiones celulares en las distintas cohortes. En la cohorte inicial los 3 primeros pacientes recibirán la dosis de  $7.5 \times 10^6$  en una frecuencia de 2 dosis por ciclo. Se realizarán análisis intermedios de toxicidad intra and inter-cohorte, que consistirán en el análisis de efectos adversos. Habrá un análisis intermedio intra-cohorte una semana después de la primera tanda de 2 infusiones. Si en este análisis no se observa ningún efecto adverso de grado 4 se procederá al segundo ciclo e inclusión de otros pacientes. Si al final del segundo ciclo de la primera cohorte el análisis intermedio de toxicidad es igual o menor de 1 efecto adverso de grado 3 o 4 en el conjunto de los 3 pacientes, los siguientes 3 pacientes podrán incorporarse a la cohorte 2, con la misma dosis pero frecuencia de 3 dosis por ciclo. De la misma manera si al final del segundo ciclo de los pacientes en la cohorte 2 el análisis de toxicidad es menor de 1 efecto adverso en el conjunto de los pacientes de la cohorte 2, los pacientes restantes entraran en la cohorte 3, con la misma dosis y frecuencia de 4 dosis en cada ciclo. Si los análisis de toxicidad son negativos en la primera cohorte se parará el ensayo, si lo son en la segunda o tercera se bajará la frecuencia de dosis a la de la cohorte anterior.

La premedicación de la infusión de las células NKAES se hará con paracetamol y difenhidramina, el uso de corticoides no estará permitido ya que afecta la funcionalidad de las células NK.

Con respecto al tratamiento de quimioterapia se tendrán en cuenta

	<b>PROTOCOLO DE ENSAYO CLINICO</b>	<b>Fecha</b>	<b>Versión</b>	<b>Pág.</b>
		19-12-12	3	5/66
		<b>Código:</b>	NK-VS-MM	

las contraindicaciones, interacciones y precauciones de uso y reducciones de dosis indicadas en las fichas técnicas correspondientes.

**Desarrollo del estudio** **Cronograma y esquema del estudio**

Actividad	Feb 2013	Mar 2013	Abr 2013	May 2013	Jun 2013	Jul 2013	Aug 2013	Sep 2013	Oct 2013	Nov 2013	Dic 2013	Ene2014-Ene2015
Selección /inclusión/ Tratamiento												
Procesamiento NKAes												
Estudios biológicos y data manager												
Seguimiento												
Análisis datos												

**Variables de estudio** **Variable principal:**

Incidencia de toxicidad clínica y de laboratorio. La toxicidad se medirá según los criterios de toxicidad del *National Cancer Institute V3.0*

**Variable secundaria:**

- Variables de eficacia. Determinar la eficacia de la infusión de células NK en términos de incremento de la respuesta según reducción de componente monoclonal o mejora de la calidad de la respuesta según los criterios IMF/EBMT.

**Variable de seguridad:**

- La seguridad y tolerancia de los tratamientos se evaluará mediante el registro de los cambios en la aparición y naturaleza de cualquier acontecimiento adverso durante el estudio

**Análisis estadístico**

Las variables del estudio se recogerán en una base de datos relacional, el análisis se realizará con el programa STATA v10. Se realizarán tablas resumen que expondrán el número de observaciones, media, desviación estándar, mediana, mínimo y máximo para variables continuas y número y porcentaje por categoría para datos categóricos. La comparación de variables continuas se realizará mediante la t-student y la comparación de variables categóricas mediante  $\chi^2$ .

Se usaran curvas de Kaplan-Meier para el análisis de la supervivencia y comparar la curvas de supervivencia se usará el test de Log-rank. Un valor de  $P < 0.005$  será

	<b>PROTOCOLO DE ENSAYO CLINICO</b>	<b>Fecha</b>	<b>Versión</b>	<b>Pág.</b>
		19-12-12	3	6/66
		<b>Código:</b>	NK-VS-MM	

---

considerado estadísticamente significativo.

---

**Calendario** Solicitud CEIC: 02/2012  
Reclutamiento: Feb 2013- Ene 2014  
Fase experimental: Feb 2013- Ene 2015  
Informe Final: Ene 2015

---

Para más información, todos los datos relativos al protocolo del ensayo clínico y a los resultados del mismo se encuentran recogidos en el siguiente enlace:

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results?term=NCT02481934&Search=Search>